

ISSN 0355-1180

HELSINGIN YLIOPISTO

Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos

EKT-sarja 1465

3-MCPD-RASVAHAPPOESTERIEN GC-MS-ANALYTIKKA

Minna Isotupa

Helsinki 2010

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen		Laitos — Institution — Department Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos	
Tekijä — Författare — Author Minna Isotupa			
Työn nimi — Arbetets titel — Title 3-MCPD rasvahappoesterien GC-MS-analytiikka			
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarvikekemia			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterin tutkielma		Aika — Datum — Month and year Helmikuu 2010	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 53
<p>3-Kloro-1,2-propanolit (3-MCPD) ja niiden rasvahappoihin esteröityneet muodot ovat tunnettuja elintarvikkeisiin prosessoinnin yhteydessä syntyviä haitta-aineita. Tutkielman kirjallisuusosassa perehdyttiin 3-MCPD-rasvahappoesterien kemiallisiin ominaisuuksiin, analytiikkaan ja esiintymiseen elintarvikkeissa sekä muodostumiseen vaikuttaviin tekijöihin.</p> <p>Kokeellisen työn tavoitteena oli vertailla käytössä olevia 3-MCPD-rasvahappoesterien analyysimenetelmiä keskenään ja ottaa Elintarvikeeturvallisuusvirastossa käyttöön 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämiseen soveltuva menetelmä. Menetelmien eroja tutkittiin sekä itse syntetisoitujen 3-MCPD-palmitiiniesterien että palmuöljynäytteiden avulla. Vertailussa tutkittiin 3-MCPD:n mahdollista hajoamista natriummetoksidimenetelmässä sekä mahdollisen ylimääräisen 3-MCPD:n muodostumista öljynäytteisiin happohydrolyysimenetelmässä. 3-MCPD-rasvahappoesterit määritettiin vapaana 3-MCPD:nä avaamalla esterisidos joko rikkihapon ja metanolin avulla tapahtuvan happohydrolyysin tai natriummetoksidin avulla tapahtuvan vaihtoesteröinnin avulla. Hydrolyysin jälkeen 3-MCPD:stä tehtiin haihtuvat johdos fenyyliboronihapon avulla ja määritettiin GC-MS:llä.</p> <p>Syntetisoitujen 3-MCPD-palmitiiniesterien saannot olivat natriummetoksidi-menetelmällä vain noin 48 % happohydrolyysimenetelmän vastaavista saannoista. Ero oli tilastollisesti merkittävä 95 %:n merkitsevyystasolla. Tulosten perusteella natriummetoksidimenetelmä hydrolysoi 3-MCPD-palmitiiniestereitä huonommin kuin happohydrolyysimenetelmä tai hydrolysoitu 3-MCPD hajoaa hydrolyysin aikana. Palmuöljynäytteiden määrittämisessä ei pystytty osoittamaan, että ylimääräistä 3-MCPD:tä syntyisi happohydrolyysin aikana. Pitoisuudet olivat suurempia käytettäessä natriummetoksidimenetelmää. Tulosten hajonta oli molemmilla menetelmillä suuri, mistä johtuen työtä tulisi edelleen jatkaa uusimalla analyysit öljynäytteillä.</p> <p>Tässä tutkimuksessa pystyttiin osoittamaan, että käytetyissä hydrolyysimenetelmissä on eroa 3-MCPD-rasvahappoesterien saannon suhteen, mikä tulee huomioida jatkossa menetelmän valintaa tehdessä.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords 3-MCPD-rasvahappoesterit, hydrolyysi, GC-MS			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikin tiedekirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-sarja 1465. Julkinen 15.2.2010.			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty		Laitos — Institution — Department	
Faculty of Agriculture and Forestry		Department of Applied Chemistry and Microbiology	
Tekijä — Författare — Author Minna Isotupa			
Työn nimi — Arbetets titel — Title GC-MS analysis of 3-MCPD fatty acid esters			
Oppiaine — Läroämne — Subject Food Chemistry			
Työn laji — Arbetets art — Level M. Sc. Thesis	Aika — Datum — Month and year February 2010	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 53	
Tiivistelmä — Referat — Abstract			
<p>3-Chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its esterified forms are food-borne contaminants. The chemical properties of fatty acid esters of 3-MCPD and their formation in foodstuffs as well as the analytical methods used to detect them were reviewed.</p> <p>The aim of the experimental work was to compare the analytical methods used to detect 3-MCPD esters and to obtain a method for detection of 3-MCPD fatty acid esters in Finnish Food Safety Authority (EVIRA). Synthesised 3-MCPD palmitate esters and palm oil samples were used to detect differences between the methods. Decomposition of 3-MCPD during hydrolysis with sodium methoxide was studied as well as the formation of excess 3-MCPD in palm oil samples during acid hydrolysis. 3-MCPD fatty acid esters were determined as free 3-MCPD by GC-MS after hydrolysis and derivatisation with phenylboronic acid. Free 3-MCPD was cleaved from 3-MCPD esters using acidic hydrolysis with sulphuric acid and methanol or transesterification with sodium methoxide.</p> <p>The amount of 3-MCPD obtained after the hydrolysis of synthesised 3-MCPD esters with sodium methoxide was only 45 % of that obtained after acid hydrolysis. There was a statistical difference between the means at a 95 % level of significance. The formation of excess 3-MCPD during acid hydrolysis was not proven from the results obtained from the palm oil samples. Results showed the opposite, as the amount of 3-MCPD obtained was larger after hydrolysis with sodium methoxide. The precision of the results was poor possibly due to a large systematic error and should be renewed in the future. The results showed there is a significant difference between the two methods of hydrolysis and that the choice between the methods can influence the recovery of the 3-MCPD esters.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords 3-MCPD esters, hydrolysis, GC-MS			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikki Science Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT Series 1465. Public 15.2.2010.			

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ESIPUHE

1	JOHDANTO	7
2	KIRJALLISUUSTUTKIMUS	10
2.1	3-MCPD-RASVAHAPPOESTERIT	10
2.1.1	Kemialliset ominaisuudet ja rakenne	10
2.1.2	Esiintyminen elintarvikkeissa	11
2.1.3	Muodostumismekanismit	14
2.1.4	Muodostumiseen vaikuttavat tekijät	17
2.2	3-MCPD-RASVAHAPPOESTERIEN ANALYTIikka	19
2.2.1	Yleistä analytiikasta	19
2.2.2	Esterisidosten kemiallinen hydrolyysi	20
2.2.3	Esterisidosten entsymaattinen hydrolyysi	22
2.2.4	Haihtuvien johdosten muodostaminen GC-MS määrittystä varten	22
2.2.5	3-MCPD-mono- ja diesterien määrittäminen GC-MS:llä	26
3	KOKEELLINEN TUTKIMUS	27
3.1	Materiaalit ja menetelmät	27
3.1.1	Koeasetelma	27
3.1.2	Koemateriaalit	27
3.1.3	Menetelmät	30
	3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien synteesimenetelmä	30
	Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien määrittäminen eri hydrolyysimenetelmillä	31
	Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien natriummetoksidi-hydrolyysiin perustuva määrittäminen	32
	Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien happohydrolyysiin perustuva määrittäminen	32
	Palmuöljyn 3-MCPD-rasvahappesterien natriummetoksidi-hydrolyysiin perustuva määrittäminen	33
	Palmuöljyn 3-MCPD-rasvahappesterien happohydrolyysimenetelmään perustuva määrittäminen	33
	Haihtuvien johdosten muodostaminen fenyyliboronihiapon avulla	34
	Kaasukromatografi-massaspektrometrinen määrittäminen (GC-MS)	34
	Kvantitatiivinen määrittäminen	35
	Menetelmän luotettavuus	35

3.2	Tulokset	37
3.2.1	Kvantitatiivisen määrityksen tulokset	37
3.2.2	Syntetisoiduista 3-MCPD-palmitiiniestereistä natriummetoksidi- menetelmällä ja happohydrolyysimenetelmällä mitatut tulokset	38
3.2.3	Öljynäytteistä natriummetoksidimenetelmällä ja happohydrolyysimenetelmällä mitatut tulokset	40
3.3	Pohdinta	42
3.3.1	3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien synteesi	43
3.3.2	Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien määrittäminen natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmillä	44
3.3.3	Palmuöljynäytteiden määrittäminen natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmillä	46
3.3.4	Natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmien käytön vertailu	47
4	PÄÄTELMÄT	48
	LÄHDELUETTELO	50
	LIITTEET	53
	Liite 1. Hydrolysoitujen 3-MCPD:n ja 3-MCPD-d5:n kaasukromatogrammien piikkien pinta-alat	

Tämä maisterin tutkielma tehtiin Elintarviketurvallisuusvirastossa, kemian ja toksikologian tutkimusyksikön vierasainejaostossa, kesän ja syksyn 2009 aikana.

Haluan kiittää työni ohjaajaa, tutkija Seija Bergiä Evirasta, avusta työni kokeellisessa osassa. Helsingin yliopistosta haluan kiittää työni ohjaajaa Velimatti Ollilaista ja erityisesti työni valvojaa Vieno Piirasta, joka työni viime metreillä oli suureksi avuksi.

Haluan kiittää lämpimästi myös koko Eviran vierasainejaoston henkilökuntaa lämpimästä työilmapiiristä. Erityiset kiitokset haluan lausua Marjatta Pöyhöselle ja Laura Torvikoskelle, joilta sain aina apua sitä tarvitessani.

Lopuksi haluan kiittää vanhempiani ja ystäviäni kannustuksesta ja erityisesti rakasta avopuolisoani Pekkaa, jonka ansiosta tämä työ valmistui.

Helsingissä, helmikuussa 2010

Minna Isotupa

1 JOHDANTO

Klooripropanoliyhdisteet ovat elintarvikkeisiin sekä teollisen prosessoinnin että kotitalouksien ruoanvalmistuksen yhteydessä syntyviä haitta-aineita (Breitling-Utzmann ym. 2005; Hamlet 2008). 3-kloro-1,2-propanoli (3-MCPD) on yleisin elintarvikkeista mitattu klooripropanoliyhdiste (Hamlet 2008). Sitä esiintyy noin kolme kertaa enemmän kuin 2-kloro-1,3-propanolia tai diklooripropanoleja. 3-MCPD esiintyy elintarvikkeissa sekä vapaana että pitkäketjuisiin rasvahappoihin esteröityneenä muotona. Rasvahappoihin esteröitynyttä 3-MCPD:tä pidetään esiasteena sekä vapaan 3-MCPD:n että diklooripropanolien muodostumisessa (Collier ym. 1991). Elintarvikkeiden sisältämät lipaasit pystyvät hydrolysoimaan 3-MCPD-rasvahappoestereitä vapaaksi 3-MCPD:ksi esimerkiksi varastoinnin aikana (Hamlet ja Sadd 2004). Ensimmäisen kerran 3-MCPD:tä löydettiin hydrolysoidusta kasviproteiinista 1970-luvulla. Muutamaa vuotta myöhemmin havaittiin hydrolysoidun kasviproteiinin sisältävän myös esteröityneessä muodossa esiintyvää 3-MCPD:tä (Hamlet 2008).

Tutkimukset ovat osoittaneet, että vain pieni osa 3-MCPD:stä esiintyy elintarvikkeissa vapaassa muodossa suurimman osan 3-MCPD:stä ollessa rasvahappoihin esteröityneessä muodossa (Svejkovská ym. 2004). Erityisesti kasviöljyistä ja niistä valmistetuista lämpöprosessoiduista tuotteista on mitattu suuria 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia. Kasviöljyissä pitoisuuksien on havaittu suurenevan öljyjen käsittelyn myötä (Franke ym. 2009). Neitsyt-öljyissä ja kylmäpuristetuissa öljyissä pitoisuudet ovat olleet erittäin pieniä tai alle määritysrajan (Zelinková ym. 2006). Öljyjen puhdistusmenetelmistä erityisesti kuumahöyrytysvaiheen on havaittu suurentavan 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia (Franke ym. 2009).

3-MCPD:n on rotilla havaittu aiheuttavan munuaistoksisuutta sekä vaikuttavan urosten hedelmällisyyteen. EU on asettanut vapaan 3-MCPD:n pitoisuuksille soijakastikkeissa ja hydrolysoidussa kasviproteiinissa rajoituksen $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ kuiva-ainetta kohti (European Commission 2001), minkä lisäksi JEFCA (2002) on ehdottanut tilapäiseksi korkeimmaksi siedettäväksi vuorokausiannokseksi (PMTDI) $2 \mu\text{g}$ 3-MCPD:tä painokiloa kohti. Rasvahappoihin esteröityneen 3-MCPD:n toksisuudesta ei ole vielä saatavilla tutkimustietoa eikä sille ole asetettu raja-arvoja. On kuitenkin osoitettu, että elimistön

lipaasit pystyvät hydrolysoimaan näitä asyyliglyserolien kaltaisia yhdisteitä (Seefelder ym. 2007).

3-MCPD:n diestereissä rasvahapot ovat esteröityneinä asemiin sn-1 ja sn-2. Ruoansulatuksen lipaasit suosivat asyyliglyserolien sn-1 ja sn-3 asemia, mistä johtuen vapaan 3-MCPD:n muodostuminen sn-1-monoestereistä oli diestereitä nopeampaa. Diesterit puolestaan hydrolysoituivat sn-2-monoestereiksi, jotka imeytyivät suoraan verenkiertoon, mikä saattaa osaltaan selittää mm. äidinmaidosta tehdyt 3-MCPD-rasvahappoesterilöydökset (Seefelder ym. 2007; Zelinková ym. 2008).

Tällä hetkellä 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia eri elintarvikkeista on määritetty vasta melko suppeasta joukosta elintarvikkeita (Svejková ym. 2004; Zelinková ym. 2006). Määrittäviä rajoittaa käytettävien standardimenetelmien puuttuminen. Käytännössä määrittäminen on tehty käyttämällä analyysimenetelmää, jossa esteröitynyt 3-MCPD hydrolysoidaan vapaaksi 3-MCPD:ksi, minkä jälkeen siitä tehdään haihtuva johdos, joka analysoidaan kaasukromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmällä (GC-MS) (Divinová ym. 2004; Weißhaar 2008). Käytössä olevalla menetelmällä ei pystytä erottamaan mono- ja diesterimuotoja. Haastetta menetelmien oikeellisuuden määrittämiseen puolestaan tuo 3-MCPD-rasvahappoesterien vertailumateriaalien puuttuminen.

Analyttisten haasteiden lisäksi klooripropanolihydrateet luovat haasteita myös elintarviketeollisuudelle. Esimerkiksi 3-MCPD-rasvahappoesterien muodostusmekanismeja ei ole vielä voitu täysin todentaa. Tiettyjen olosuhteiden kuten pH:n, vesipitoisuuden, lämpötilan sekä lipidien ja kloori-ionien suurien pitoisuuksien on havaittu lisäävän 3-MCPD:n ja siten mahdollisesti myös 3-MCPD-rasvahappoesterien muodostusta (Hamlet ym. 2003, Hamlet ym. 2004ab; Calta ym. 2004).

Elintarviketuotannossa mm. kloridi-ionien lähteiden kartoittaminen on merkittävä osa elintarvikkeiden prosessien kehittämistä sellaisiksi, että 3-MCPD:n ja sen rasvahappoihin esteröityneen muodon syntymistä voidaan ehkäistä.

Tämän tutkimuksen kirjallisuustutkimuksen tavoitteena oli kartoittaa 3-MCPD-rasvahappestereistä saatavilla olevaa tietoutta. Erityisesti tarkasteltiin niiden esiintyvyyttä eri elintarvikkeissa sekä niiden analytiikkaan liittyvää tietoutta kriittisesti.

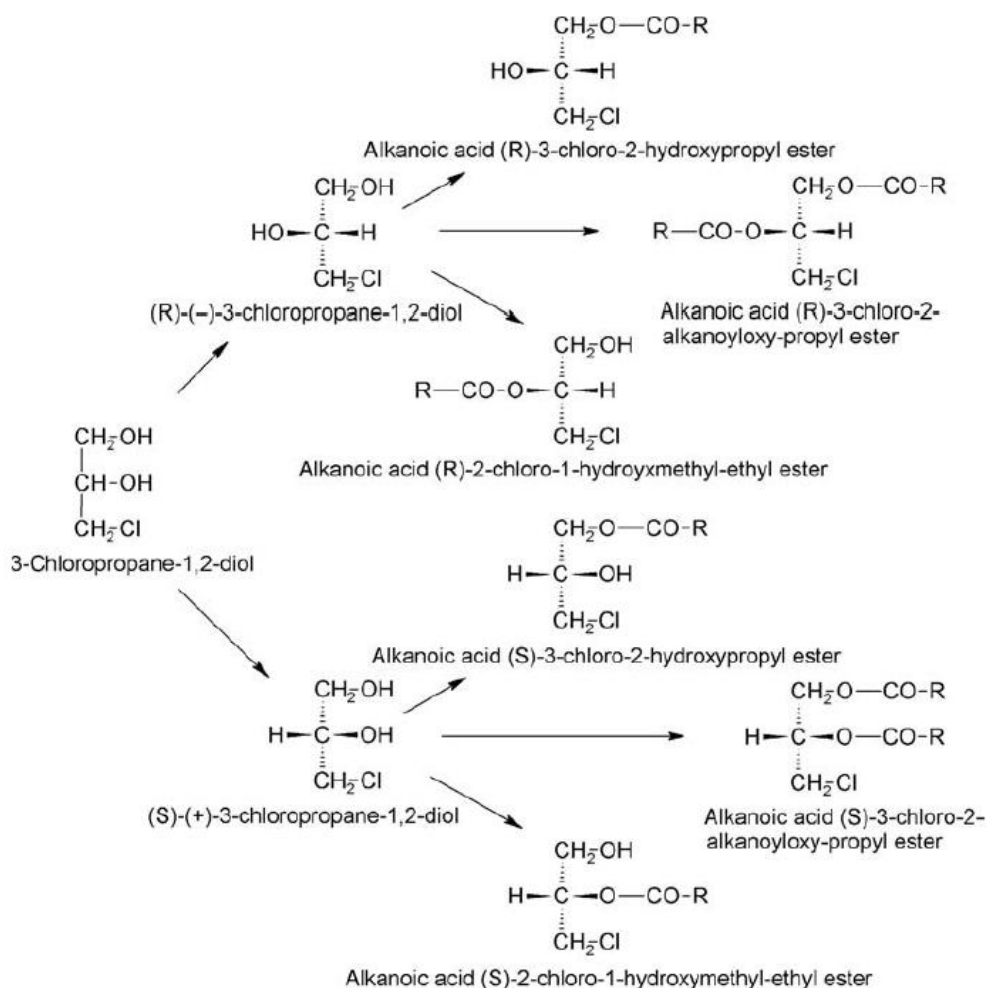
Kokeellisen tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla käytössä olevia analyysimenetelmiä keskenään ja sitä kautta löytää Elintarviketurvallisuusvirastolle menetelmä, joka voidaan myöhemmin validoida ja ottaa käyttöön siinä tapauksessa, että 3-MCPD-rasvahappestereiden pitoisuuksille elintarvikkeissa esitetään valvottava raja-arvo.

2 KIRJALLISUUSTUTKIMUS

2.1 3-MCPD-RASVAHAPPOESTERIT

2.1.1 Kemialliset ominaisuudet ja rakenne

3-kloropropaani-1,2-diolit esiintyvät elintarvikkeissa sekä vapaana että rasvahappoihin esteröityneenä muotona (kuva 1). 3-MCPD-esterit ovat kemiallisilta ja fysikaalisilta ominaisuuksiltaan asyyloglyserolien kaltaisia (Seefelder ym. 2007). Esteröitymätön 3-MCPD on poolinen ja heikosti haihtuva yhdiste, joka voi läpikäydä alkoholeille ja alkyyliklorideille tyypillisiä reaktioita. Sen tiedetään reagoivan mm. alkoholien, ketonien ja orgaanisten happojen sekä tiolien kanssa (Hamlet 2008). 3-MCPD ja sen rasvahappoihin esteröityneet muodot ovat kiraalisia yhdisteitä ja niiden optiset isomeerit esiintyvät elintarvikkeissa raseemisena seoksena (Velíšek ym. 2002).



Kuva 1. 3-MCPD:n ja 3-MCPD-rasvahappoesterien eri isomeerit (Hamlet 2008).

Elintarvikkeista on mitattu sekä 3-MCPD-mono- että diestereitä. 3-MCPD-rasvahappoestereistä diesterien osuus on huomattavasti monoestereitä suurempi diesterien osuuden ollessa noin 85 % (Seefelder ym. 2007; Zelinková ym. 2009). Yleisimmät 3-MCPD:hen esteröityneet rasvahapot ovat pitkäketjuisia rasvahappoja. Äidinmaidon vastikkeiden rasvafraktiosta analysoidut 3-MCPD-rasvahappoesterit olivat suurimmaksi osaksi palmitiini- ja öljyhapoista muodostuneita asymmetrisiä diestereitä. Äidinmaidossa suurin osa 3-MCPD-diestereistä puolestaan oli symmetrisiä diestereitä, jotka olivat muodostuneet joko palmitiini-, öljy- tai lauriinihaposta (Zelinková ym. 2008).

2.1.2 Esiintyminen elintarvikkeissa

3-MCPD- rasvahappoestereiden pitoisuuksia on tähän päivään mennessä määritetty vasta melko suppeasta joukosta elintarvikkeita (taulukko 1). Näissä tutkimuksissa on kuitenkin havaittu esteröityneen 3-MCPD:n pitoisuuksien ylittävän vapaan 3-MCPD:n pitoisuudet 5–400-kertaisesti (Svejkovská ym. 2004). Tutkimuksissa on analysoitu sekä yksittäisiä raaka-aineita että erityisesti erilaisia kasviöljyjä sisältäviä prosessoituja elintarvikkeita.

Taulukko 1 Elintarvikkeista GC-MS:llä mitatut 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuudet.

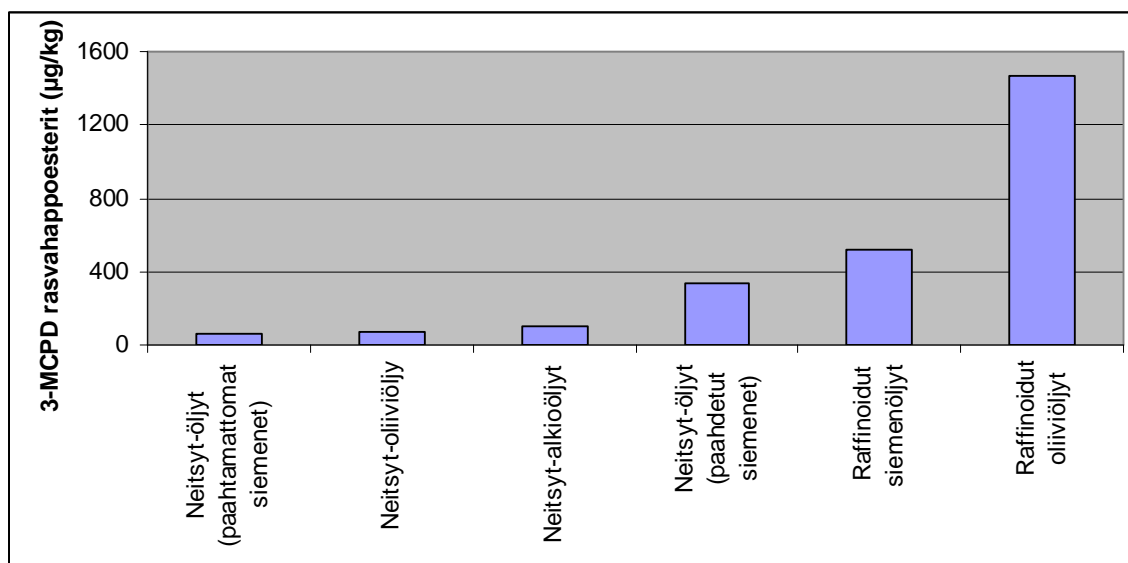
Elintarvike	Pitoisuus $\mu\text{g kg}^{-1}$	Lähde
Kahvi, paahdettu	290	Doležal ym. 2005
Kahvi, paahtamaton	6-170	
Kahvinkorvikkeet	145-1184	Divinová ym. 2007
Kahvikermat	150-590	Karsulinova ym. 2007
Aerosolikermat	10-660	
Lihaliemikuutiot	209-318	
Peruna, raaka	2,2	Zelinková ym. 2009
Ranskanperuna, esipaistettu	27-64	
Ranskanperuna, paisto 2+3 min.	100-258	
Perunalastut	229-1008	
Vehnäleipä, sisus	6,7	Hamlet ja Sadd 2004
Vehnäleipä, kuori	547	
Paahdettu leipä	160	
Neitsyt-siemenöljyt	100	Zelinková ym. 2006
Raffinoidut kasviöljyt	<300-1234	
Raffinoidut oliiviöljyt	<300- 2462	Zelinková ym. 2009 Karsulinova ym. 2007
Palmuöljy	654-1920	
Palmuöljy	1390-4170	
Palmunydinöljy	850-1400	
Kookosöljy	1418-1694	
Lasten ja imeväisten ruoat	62- 464	Zelinková ym. 2009
Äidinmaito	11-63	Zelinková ym. 2008

3-MCPD-rasvahappoestereitä on määritetty mm. vehnästä valmistetusta leivästä (Hamlet ja Sadd 2004), jossa erityisesti leivän kuoriosaan oli muodostunut 3-MCPD-rasvahappoestereitä ($547 \mu\text{g kg}^{-1}$). Pitoisuudet leivän sisäosassa oli huomattavasti kuoren pitoisuuksia pienempiä ($6,7 \mu\text{g kg}^{-1}$). Samassa yhteydessä paahtamisen havaittiin lisäävän leivän 3-MCPD-esterien pitoisuuksia ($160 \mu\text{g kg}^{-1}$). Myös Breitling-Utzmann ym. (2005) määrittivät 3-MCPD:n pitoisuuksia vehnäleivästä ja havaitsivat paahtetun leivän 3-MCPD:n pitoisuuden olevan keskimäärin noin $215 \mu\text{g kg}^{-1}$ näytettä kohti.

Paahdetuista viljatuotteista myös kahvikorvikkeina käytetyistä viljoista mitattiin 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia välillä $145\text{--}1184 \mu\text{g kg}^{-1}$ näytettä kohti (Divinová ym. 2007). Pitoisuudet olivat pienempiä rukiissa ($145 \mu\text{g kg}^{-1}$) ja suurimpia ohrassa ($1184 \mu\text{g kg}^{-1}$). Doležal ym. (2005) puolestaan määrittivät esteröityneen 3-MCPD:n pitoisuuksia kahvista. Mitatut pitoisuudet olivat paahtetussa kahvissa keskimäärin $290 \mu\text{g kg}^{-1}$ ja paahtamattomassa kahvissa välillä $6\text{--}170 \mu\text{g kg}^{-1}$ kahvia kohti.

Erilaisia maltaita vertailtaessa suurimmat 3-MCPD esterien pitoisuudet havaittiin paahdetuissa maltaissa, joissa pitoisuudet vaihtelivat välillä $4\text{--}650 \mu\text{g kg}^{-1}$ näytettä kohti (Divinová ym. 2007).

Erityisesti eri kasviöljyjen 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia on kartoitettu (Zelinková ym. 2006; Karšulinová ym. 2007; Seefelder ym. 2007; Zelinková ym. 2009). Öljyjen sisältämät pitoisuudet vaihtelevat suuresti ($<300\text{--}4170 \mu\text{g kg}^{-1}$) niiden lähtöaineiden ja valmistustavan mukaan (kuva 2).



Kuva 2 3-MCPD rasvahappojen esterien pitoisuudet eri kasviöljyissä GC-MS:llä määritettynä (Zelinková ym. 2006).

3-MCPD esterien pitoisuudet olivat suurimmat öljyissä, joiden raaka-aineina oli käytetty hedelmänlihaa kuten oliivi-, palmu- ja kookosöljyissä (Karšulinová ym. 2007), paahtettuja siemeniä (Zelinková ym. 2006) tai niiden valmistukseen oli käytetty lämpökäsittelyitä (Zelinková ym. 2006; Karšulinová ym. 2007; Seefelder ym. 2007). Vapaan 3-MCPD:n osuus kasviöljyissä on ollut raaka-aineesta ja lämpökäsittelyistä huolimatta erittäin pieni, alle $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Zelinková ym. 2006).

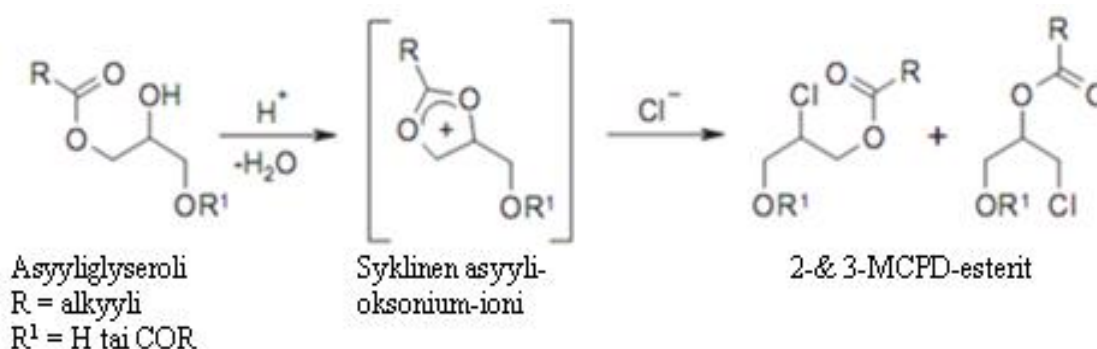
Odotetusti kasviöljyjä sisältävistä prosessoiduista elintarvikkeista on mitattu 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia. Svejkovská ym. (2004), löysivät 3-MCPD-rasvahappoestereitä useista erilaisista elintarvikkeista kuten suolaisista kekseistä, savustetussa kinkusta, säilötyssä silakasta ja ranskanperunoista ja -lastuista. Myös kahvikermoista ja aerosolikermoista sekä lihaliemikuutioista on löydetty 3-MCPD rasvahappoestereitä (Karšulinová ym. 2007). Zelinková ym. (2009) tutkivat ranskanperunoiden paistoajan merkitystä 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuteen. 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksien havaittiin suurenevan paistoajan pidentyessä vaihdellen välillä $27\text{--}258 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Kasviöljyjä sisältävien eri-ikäisille vauvoille tarkoitettujen äidinmaidonkorvikkeiden havaittiin sisältävän 3-MCPD rasvahappoestereitä pitoisuuksissa $62\text{--}464 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Zelinková ym. 2009). Äidinmaidonvastikkeiden lisäksi myös äidinmaidosta on mitattu pitoisuuksia $11\text{--}63 \mu\text{g kg}^{-1}$ äidinmaitoa (Zelinková ym. 2008).

2.1.3 Muodostumismekanismit

3-MCPD-rasvahappoesterit toimivat esiasteina 3-MCPD:n muodostumisessa, jolloin 3-MCPD-diesterit voivat hydrolysoitua esim. suolahapon avulla monoestereiksi ja edelleen vapaaksi 3-MCPD:ksi (Velíšek ym. 2002). Lisäksi elintarvikkeiden sisältämät lipaasit voivat hydrolysoida esteröitynyttä 3-MCPD:tä vapaaksi 3-MCPD:ksi (Robert ym. 2004). Vaikka vapaan 3-MCPD:n ja 3-MCPD-rasvahappoesterien muodostumisen välistä yhteyttä ei ole pystytty osoittamaan, havaitsivat Hamlet ja Sadd (2004), että leivän paahtamisen yhteydessä molempien yhdisteiden pitoisuudet suurenivat samassa suhteessa paahtoajan pidentyessä ja lämpötilan suurentuessa, mikä saattaa viitata yhteiseen syntymekanismiin.

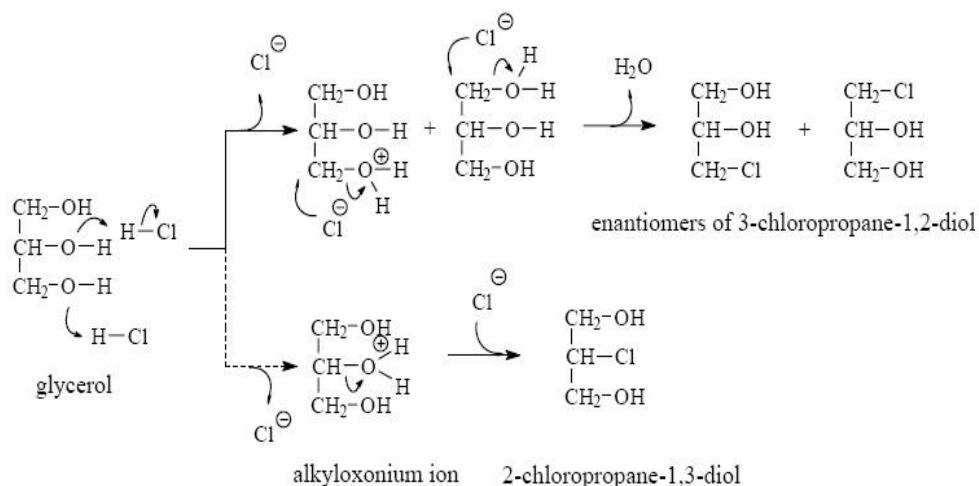
Collierin ym. (1991) mukaan kloropropanoleja syntyy pääsääntöisesti osittaisten diesterien kautta eikä siten, että triasyyliglyserolit hydrolysoituisivat ensin glyseroliksi. Tällöin diesterit muodostavat pysymättömän syklisen asyylioksonium-ionin, joka reagoi edelleen läsnä olevien kloridi-ionien kanssa muodostaen joko 3-MCPD- tai 2-MCPD-diesteriä. Diesterit saattavat hydrolysoitua edelleen monoestereiksi, jolloin samalla mekanismilla muodostuu myös 3-MCPD- tai 2-MCPD-monoestereitä (kuva 3).



Kuva 3. Monoklooripropanoliesterien muodostuminen asyyliglyserolista pysymättömän syklisen asyylioksonium-ioni välituotteen kautta (Velíšek ym. 2002)

Hamlet ym. (2004a,b) seurasivat 3-MCPD:n muodostumista sekä nostatettuun että nostattamattomaan taikinaan. Nostatetussa taikinassa 3-MCPD:n pääasialliseksi lähteeksi osoittautui glyseroli. Glyserolia muodostuu taikinaan hiivan käymisen tuloksena nostatuksen aikana. Nostattamattomassa taikinassa puolestaan valkoisten jauhojen sisältämät monoasyyliglyserolit, lysofosfolipit ja fosfatidyyliglyserolit osoittautuivat 3-MCPD:n lähteiksi. Viimeaikaisessa tutkimuksessa havaittiin myös joissain

leipomotuotteissa makeutusaineena toimivan sukraloosin hajoavan tuotteen paiston yhteydessä ja vapauttavan klooria. Tämän jälkeen taikinan sisältämä glyseroli saattaa reagoida kloori-ionien kanssa muodostaen 3-MCPD:tä ja muita kloropropanoleja (Rahn ja Yaylayan 2010). Glyserolin tiedetään reagoivan esimerkiksi suolahapon kanssa (kuva 4) muodostaen sekä 3- että 2-MCPD:tä (Velíšek ym. 2002).



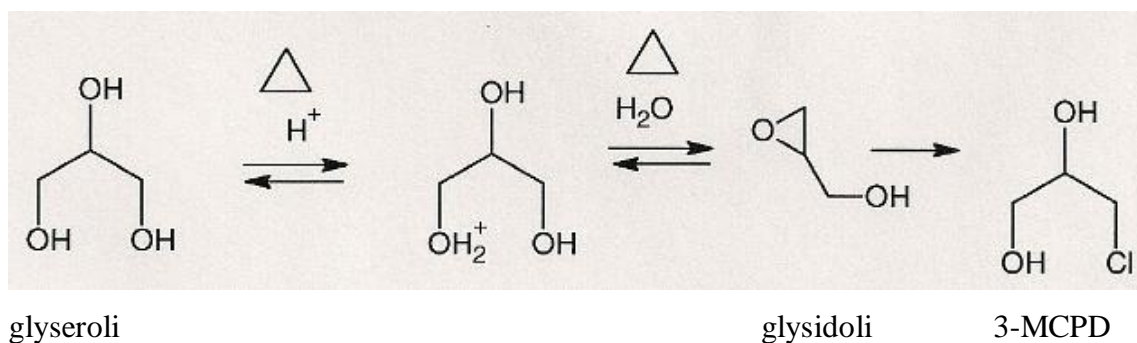
Kuva 4. Kloropropanolien muodostuminen glyserolin ja suolahapon välisessä reaktiossa (Velíšek ym. 2002).

Hamlet ym. (2004a,b) havaitsivat, ettei triasyyliglyseroleista muodostunut lainkaan 3-MCPD:tä nostatettavan taikinan yhteydessä. Mahdollisten 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia ei mitattu. Sen sijaan mono- ja diasyyliglyseroleista 3-MCPD:tä muodostui, joskin vähäisempiä määriä kuin glyserolista. Muodostumismekanisminä ehdotettiin syklisen asyylioksonium-ionin kautta tapahtuvaa mekanismia (kuva 3) ja samalla myös arveltiin viimeisen hydrolyysivaiheen olevan muodostumisnopeutta kontrolloiva vaihe (Hamlet ym. 2004a,b). On mahdollista, että leivontarasvojen sisältämät triasyyliglyserolit eivät ehdi hydrolysoitua di- ja monoasyyliglyseroleiksi ja reagoida edelleen kloori-ionien kanssa leivän valmistukseen kuluvaan ajassa.

Kasviöljyistä erityisesti palmuöljyistä on mitattu suuria 3-MCPD-esteripitoisuuksia, minkä lisäksi niiden on havaittu sisältävä erittäin suuria määriä diasyyliglyseroleja (Franke ym. 2009). Kasviöljyissä noin 85 % 3-MCPD-rasvahappoestereistä on diestereitä (Seefelder ym. 2008; Zelinková ym. 2009).

Velíšek ym. (2002) havaitsivat koeasetelmalla, että 3-MCPD:n muodostuminen trioleiinista oli neljä ja lesitiinistä kaksi kertaa suurempaa kuin glyserolista. Vähäisenä määrinä elintarvikkeissa esiintyvien fosfolipidien ei havaittu olevan merkittävä 3-MCPD:n lähde (Velíšek ym. 2003).

Kloropropanolien diestereitä saattaa syntyä myös suoran nukleofiilisen substituution kautta, jolloin kloori-ioni substituoii triasyyliglyserolin tai diasyyliglyserolin asyyliiryhmän (Velíšek ym. 2002). Triasyyliglyseroleista muodostuu siten diestereitä ja diasyyliglyseroleista monoestereitä.



Kuva 5. 3-MCPD:n muodostuminen glyserolista glysidolin kautta (Hamlet ym. 2004).

Edellisten muodostumismekanismien lisäksi Hamlet ym. (2004) ehdottivat 3-MCPD:n muodostumista glyserolista pysymättömän reaktiotuotteen glysidolin kautta (kuva 5). Glysidoliestereitä on löydetty puhdistetusta palmuöljystä (BfR, 2009) ja ne saattavat toimia siten 3-MCPD-esterien esiasteina.

2.1.4 Muodostumiseen vaikuttavat tekijät

3-MCPD:n ja sen rasvahappoesterien muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä on tutkittu joidenkin koeasetelmien avulla. Esimerkiksi natriumkloridin pitoisuuden, vesipitoisuuden, lämpötilan, paistoajan ja elintarvikkeen koostumuksen sekä pH:n vaikutusta 3-MCPD:n muodostumiseen elintarvikkeissa on tutkittu (Hamlet ym. 2003; Calta ym. 2004; Hamlet ym. 2004ab; Franke ym. 2009).

Elintarvikkeiden vesipitoisuuden ollessa noin 13–17 % on 3-MCPD:n muodostumisen havaittu olevan suurinta. Vesipitoisuuden pienentyessä myös kloori-ionien liukoisuus pienenee ja 3-MCPD:n muodostuminen hidastuu (Hamlet ym. 2003; Calta ym. 2004). Natriumkloridin pitoisuuden havaittiin kasvattavan 3-MCPD:n muodostumista erityisesti pitoisuuden ollessa noin 4-7 % (Calta ym. 2004). Vehnäjauhoista valmistetussa taikinassa lämpötilasta huomattiin tulevan määräävä tekijä 3-MCPD:n muodostumisessa vesipitoisuuden ollessa alle 15 % (Hamlet ym. 2002). Lisäksi leivän paahtamisen on havaittu lisäävän 3-MCPD:n pitoisuuksia vehnäleivässä (Hamlet ja Sadd 2004; Breitling-Utzmann ym. 2005).

Yli 100 °C:n lämpötilalla (100–230 °C) oli positiivinen vaikutus 3-MCPD:n muodostumiseen elintarvikkeita imitoivassa mallisysteemissä (Calta ym. 2004). Öljyjen puhdistusta mukailevassa asetelmassa havaittiin kuumahöyrytysvaiheen lisäävän eniten 3-MCPD-rasvahappoesterien syntyä (Franke ym. 2009). Pitoisuudet suurenivat, kun lämpötilaa nostettiin. Pitoisuudet suurenivat erityisesti yli 200 °C:n lämpötiloissa. Hamlet ja Sadd (2004) havaitsivat, että leivän sisäosaan muodostui 3-MCPD:tä jo alle 96 °C:n lämpötilassa, mikä viittaa siihen, että 3-MCPD:tä saattaa muodostua melko matalissakin lämpötiloissa. Kuumennuksen keston ei havaittu lisäävän 3-MCPD-esterien muodostumista kasviöljyissä tutkittaessa öljyjen puhdistusprosessien vaikutusta yhdisteen syntyyn (Franke ym. 2009).

Verrattaessa 3-MCPD:n muodostusta vehnästä sekä vehnän ja rukiin seoksesta valmistettuihin leipiin havaittiin 3-MCPD:tä muodostuvan enemmän happamampaan, ruista sisältävään leipään (Doležal ym. 2009). Myös Hamlet ja Sadd (2005) havaitsivat 3-MCPD:tä muodostuvan enemmän taikinoihin, joiden pH oli välillä 3-4 kuin taikinoihin, joiden pH oli yli 5. Leipätaikinoihin lisätyn sakkaroosin ja glukoosin on myös havaittu lisäävän 3-MCPD:n muodostusta (Breitling-Utzmann ym. 2004; Hamlet ja Sadd 2005) ja suuren hiivapitoisuuden puolestaan hillitsevän sitä (Hamlet ja Sadd 2005).

2.2 3-MCPD-RASVAHAPPOESTERIEN ANALYTIikka

2.2.1 Yleistä analytiikasta

3-Monoklooripropaani-1,2-diolien rasvahappoestereitä on määritetty vasta vähän aikaa, eikä niille ole vielä olemassa virallista määritysmenetelmää. Käytännössä kaikki määritykset on tehty hydrolysoimalla 3-MCPD-rasvahappoesterit vapaaksi 3-MCPD:ksi ja muodostamalla niistä haihtuvat johdokset, jotka on analysoitu kaasukromatografien ja massaspektrometrin yhdistelmällä. Kvantitoinnissa on käytetty sisäisenä standardina isotooppileimattua viidesti deuterioitua vapaata 3-MCPD:tä (3-MCPD-d5). Menetelmällä määritetään vapaan ja vapautetun 3-MCPD:n yhteispitoisuus. Yleisesti käytössä olevalla menetelmällä ei pystytä erottamaan 3-MCPD:n mono- ja diestereitä eikä niiden eri isomeerejä.

3-MCPD-rasvahappoestereitä on määritetty esterimuodossaan ainoastaan harvoissa tutkimuksissa (Hamlet ym. 2004; Zelinková ym. 2008, 2009). Menetelmät vaativat rasvan uuttamisen näytteistä ja esterien fraktioimisen ennen GC-MS -analyysiä eikä niillä päästä kovin alhaisiin toteamisrajoihin.

3-MCPD:n vapautuminen esterisidoksista ruoansulatuksen lipaasien avulla suosii sn-1-monoasyylimuotoa, minkä vuoksi mono- ja diestereiden määrityksellä saattaa olla merkitystä elintarvikkeista saatavan vapaan 3-MCPD:n kokonaispitoisuuksia kartoitettaessa (Seefelder ym. 2008).

Haasteita 3-MCPD-rasvahappoesterien analytiikkaan tuovat 3-MCPD:n polaarisuus, heikko haihtuvuus, reaktiivisuus sekä säteilyä absorboivan atomiryhmän, kromoforin, puuttuminen. Puuttuvien kromoforien vuoksi 3-MCPD:tä ei pystytä analysoimaan nestekromatografisilla menetelmillä, joissa ilmaisimena käytetään ultravioletti- tai fluoresenssi-ilmaisinta (Hamlet 2008). 3-MCPD:n pieni molekyyllipaino puolestaan vaikeuttaa massaspektrometrisessä menetelmässä mitattavan ionin erottumista taustan kohinasta muulloin kuin MS/MS:ää käytettäessä (Hamlet 2008).

2.2.2 Esterisidosten kemiallinen hydrolyysi

Esterisidoksen avaaminen kemiallisella hydrolyysillä perustuu nukleofiiliseen asyylisubstituutioreaktioon. Esterisidos voidaan hydrolysoida joko vesipitoisen emäksen tai hapon avulla, jolloin reaktion tuotteina syntyy karboksyylihappoa ja alkoholia. Esterisidoksen avaaminen emäshydrolyysin avulla ei sovi 3-MCPD -yhdisteille, sillä ne hajoavat herkästi emäksisissä olosuhteissa glyseroliksi.

Yleisimmin käytetty 3-MCPD:n vapauttaminen perustuu käänteisesti Fisherin esteröintireaktioon, jossa estereitä muodostetaan lämmittämällä karboksyylihappoa pienen määrän vahvaa happokatalyyttiä sisältävässä alkoholiliuoksessa. Happokatalyyttiä käytetään liuoksessa lisäämään karboksyylihappojen reaktiivisuutta. Liuottimen valinnalla voidaan vaikuttaa siihen, syntyykö reaktion lopputuotteena enemmän estereitä vai karboksyylihappoja. Käytettäessä liuottimena ylimäärää alkoholia on esterin muodostuminen voimakkaampaa kuin jos liuottimena käytetään ylimäärä vettä, jolloin muodostuu enemmän karboksyylihappoja (Hoydonckx ym. 2004).

Hydrolyysi rikkihapon ja metanolin avulla

Useimmiten 3-MCPD:n esteröityneet rasvahapot on erotettu avaamalla esterisidos happohydrolyysin avulla käyttämällä happokatalyyttinä metanoliin liuotettua rikkihappoa (Zelinková ym. 2009; Zelinková ym. 2006; Divinová ym. 2004).

Käytössä olevassa menetelmässä (Divinová ym. 2004) esteröidyt 3-MCPD:t vapautetaan rikkihapon ja metanolin (1,8 ml/100 ml) avulla 40 °C:n lämpötilassa, minkä jälkeen liuos jäähdytetään huoneenlämpötilaan ja neutraloidaan NaHCO₃:lla ja haihdutetaan kuivaksi. Kuivauksen jälkeen näytteeseen lisätään 20-prosenttinen natriumkloridiliuos ja muodostetaan johdokset fenyyliboronihapon avulla ja analysoidaan GC-MS:llä. Divinová ym. (2004) optimoivat rikkihappoa katalyyttinä käyttävän metanolyysin keston vertailemalla metanolyysin keston (0-24 h) vaikutusta 3-MCPD:n saantoihin. 3-MCPD:n saanto suureni ensimmäiset 16 tuntia, minkä jälkeen se pieneni. Saannon havaittiin jäävän huonoimmaksi (32 %) metanolyysin reaktioajan ollessa kaksi tuntia. Paras saanto (99,4 %) saatiin 16 tunnin vaikutusajalla 40 °C:n lämpötilassa.

Analysoitavien näytteiden sisältäessä suuria pitoisuuksia kloori-ioneja saattaa happohydrolyysin aikana muodostua lisää vapaata 3-MCPD:tä aiheuttaen siten systemaattista virhettä analyysituloksiin (Weißhaar 2008).

Hydrolyysi natriummetoksidin ja metanolin avulla

Happohydrolyysin lisäksi 3-MCPD:n ja rasvahappojen välinen sidos voidaan avata vaihtoesteröinnin avulla käyttämällä reagenssina natriummetoksidia. Weißhaarin (2008) käyttämässä menetelmässä homogenoituihin näytteisiin lisättiin *t*-butyyli-metyylieetterin ja etyyliasetaatin seosta (8:2 v/v) ja natriummetoksidia. Kymmenen minuutin jälkeen näytteeseen lisättiin isoheksaania, jäädytettyä etikkahappoa sekä natriumkloridia, minkä jälkeen vesikerrokseen uuttuneista vapaista 3-MCPD:stä tehtiin johdokset fenyyliboronihapon avulla ja määritettiin GC-MS:llä. Sisäisenä standardina käytettiin deutoitua 3-MCPD:tä. Hydrolyysimenetelmän havaittiin aiheuttavan 3-MCPD:n hajoamista ja sisäisen standardin saannot jäivät parhaimmillaan 72-prosenttiin.

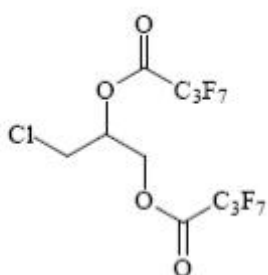
3-MCPD:n hajoaminen hydrolyysissä tapahtuu nukleofiilisen substituution avulla, kun erittäin nukleofiiliset metoksi-ionit reagoivat 3-MCPD-molekyylien kanssa (Weißhaar 2008). Menetelmän muodostamissa emäksisissä olosuhteissa kloridi ja sen viereinen hydroksyyli-ryhmä reagoivat keskenään muodostaen substituoidun oksiraanin, jonka seurauksena 3-MCPD hajoaa (Zelinková ym. 2009). Happokatalysoidusta esterin avaamisreaktiosta poiketen natriummetoksidimenetelmässä ei havaittu 3-MCPD:n muodostumista reaktion aikana kloori-ionien läsnäolosta huolimatta (Weißhaar 2008).

2.2.3 Esterisidosten entsymaattinen hydrolyysi

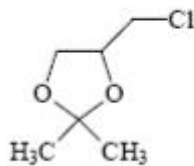
Hamlet ja Sadd (2004) käyttivät entsymaattista menetelmää viljatuotteista eristettyjen 3-MCPD-mono- ja diesterien esterisidoksen avaamiseen. Menetelmä perustui *Aspergillus oryzae*n tuottaman lipaasin käyttöön. Menetelmässä näytteet liuotettiin fosfaattipuskuriliuokseen, johon lisättiin kaupallista lipaasia. Lipaasin lisäyksen jälkeen näytettä inkuboitiin 23 °C:n lämpötilassa 24 tuntia, minkä jälkeen vapautuneista 3-MCPD yhdisteistä tehtiin heptafluorobutyryylijohdokset, jotka määritettiin GC-MS:llä. Vertailuaineena käytetyn 3-MCPD-dipalmitaatin takaisinsaanto oli 91–106 %. Menetelmässä käytetty *Aspergillus oryzae*n tuottamat lipaasit toimivat spesifisesti lyhytketjuisia rasvahappoja sisältäviin triasyyliglyseroleihin, minkä lisäksi jotkut *Aspergillus oryzae*n tuottamat lipaasit ovat hydrolyyttisesti aktiivisia myös pitkäketjuisia rasvahappoja sisältävien triasyyliglyserolien tai mono- ja diasyyliglyserolien suhteen (Hamlet ja Sadd 2004). Lipaasin spesifinen aktiivisuus on huomioitava standardiyhdistettä valittaessa.

2.2.4 Haihtuvien johdosten muodostaminen GC-MS määrittystä varten

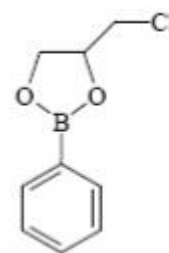
Kaasukromatografista määrittystä varten on heikosti haihtuvasta 3-MCPD:stä tehtävä haihtuvat johdokset. Viimeaikaisen kehityksen ansiosta 3-MCPD:stä on mahdollista muodostaa hyvin haihtuva ja pysyvä yhdiste, jolloin GC-MS-analyyseissä päästään $\mu\text{g kg}^{-1}$ -pitoisuustasolle. 3-MCPD-rasvahappoestereiden määrittäksiä on tehty käyttämällä johdosten muodostamisessa reagenssina fenyyliboronihappoa (Divinová, ym. 2004, Zelinková ym. 2006) tai heptafluorobutyryyli-imidatsolia (Hamlet ja Sadd 2004; León ym. 2008). Vapaan 3-MCPD:n määrittäksessä on käytetty johdostenmuodostusreagenssina edellisten lisäksi myös asetonia (Meierhans ym. 1997; Rétho ja Blanchard 2007) sekä 4-heptanonia ja TsOH:ta (Dayrit ja Niñonuevo 2004). Lisäksi 3-MCPD:stä on muodostettu johdokset silyloimalla käyttämällä reagenssina 1-trimetyylisilyyli-imidatsolia (Cao ym. 2009).



(a) 3-kloropropaani-1,2- diheptafluorobutyraatti



(b) 4-klorometyyli-2,2-dimetyyli-1,3-dioksonaani



(c) 4-kloorimetyyli-2-fenyyli-1,3,2-dioksoborolaani

Kuva 6. 3-MCPD- johdokset eri johdoksen muodostamisreagensseilla: a) heptafluorobutyryyliimidatsoli b) asetoni c) fenyyliboronihiappo (Divinová ym. 2004)

Heptafluorobutyryyliesterijohdokset

Heptafluorobutyryyli-imidatsoli (HFBI) ja heptafluorobutyryyliandhydridi (HFBA) reagoivat selektiivisesti kloropropanolien hydroksyyli ryhmien kanssa muodostaen 3-kloropropaani-1,2-diheptafluorobutyraatin (kuva 6) ja sopivat siten kaikkien kloropropanolien määrittämiseen n. 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pitoisuuksissa (Hamlet 2008). Heptafluorobutyryyliesterijohdokset tulee tehdä kuivissa olosuhteissa, sillä molemmat reagenssit ovat herkkiä kosteudelle.

Hamlet ym. (1998) käyttivät johdosten muodostumisreagenssina HFBI:tä määrittäessään 3-MCPD:tä happohydrolysoidusta vihannesproteiinista, jauhoista, leivästä, lihasta ja tärkkelyksestä. Isotooppileimattua 3-MCPD-d7:ää sisäisenä standardina käyttänyt menetelmä oli lineaarinen kalibrointialueella 5-500 $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$ ja toteamisraja (LOD) oli välillä 0,003–0,005 mg kg^{-1} . Hamlet ym. (2004a) sekä Hamlet ja Sadd (2004) analysoivat 3-MCPD-rasvahappoestereitä viljatuotteista käyttämällä hydrolyysimenetelmänä entsymaattista hydrolyysiä, minkä jälkeen vapautettu ja vapaa 3-MCPD analysoitiin heptafluorobutyryyli johdoksina GC-MS:llä. Menetelmän määrittämisraja oli $<10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Rétho ja Blanchard (2005) havaitsivat HFBI:n ja HFBA:n reagoivan kloropropanolien hydroksyyli ryhmien lisäksi myös muiden liuoksessa olevien nukleofiilien kanssa aiheuttaen kromatogrammeihin useita piikkejä.

Wenzl ym. (2007) puolestaan havaitsivat, että muodostettaessa 3-MCPD:stä johdokset HFBA:lla olivat kromatogrammien piikien pinta-alat vain noin kolmasosan 3-MCPD:n

HFBI:llä muodostetujen johdosten piikkien pinta-aloista. HFBA:lla muodostettujen johdosten piikkien pinta-alat saatiin suurenemaan, kun reaktioon lisättiin katalyytiksi trietyyliamiinia. Trietyyliamiinin ja HFBA:n yhdistelmä oli myös käytössä huomattavasti edullisempaa kuin HFBI.

Boroni happojohdokset

Fenyyliboroni hapon ja 3-MCPD:n välisessä reaktiossa syntyy 4-kloorimetyyli-2-fenyyli-1,3,2-dioksaborolaani (kuva 6). Fenyyliboroni happo reagoi spesifisesti diolien kanssa muodostaen poolittoman syklisen johdoksen, joka voidaan uuttaa heksaaniin. Spesifisen reaktion ansiosta näytettä ei tarvitse esipuhdistaa (Divinová ym. 2004).

Divinová ym. (2004) määrittivät vapaan ja esteröityneen 3-MCPD:n pitoisuuksia erilaisista elintarvikkeista käyttämällä fenyyliboroni happoa johdoksen muodostamisreagenssina. Näytteet homogenisoitiin ja uutettiin dietyylieetterillä ja suodatettiin. Suodos pestiin uudestaan dietyylieetterillä ja vedellä. Uute kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin, minkä jälkeen se liuotettiin tetrahydrofuraaniin ja hydrolysoitiin metanolyysin avulla. Näytteisiin lisättiin hydrolyysin jälkeen kylläistä natriumvetykarbonaattiliuosta sekä 20-prosenttista natriumkloridiliuosta ja uutettiin heksaanilla. Ulossuolauksen jälkeen näytteisiin lisättiin fenyyliboroni happoa ja lämmitettiin vesihauteessa 90 °C:en lämpötilaan ja pidettiin siinä 20 minuuttia. Muodostuneet johdokset uutettiin heksaaniin ja analysoitiin käyttämällä GC-MS:ää.

Menetelmä oli lineaarinen alueella 0,009–1,3 mg 3-MCPD kiloa näytettä kohti. Toteamisraja (LOD) oli 0,003 mg kg⁻¹ ja määritysraja (LOQ) 0,009 mg kg⁻¹. Zelinková ym. (2006) määrittivät erilaisista ruokaöljyistä samalla menetelmällä, pienin muutoksin, sekä esteröityneen että vapaan 3-MCPD:n pitoisuudet. Vapaan 3-MCPD:n LOD oli 0,003 mg kg⁻¹ ja LOQ 0,009 mg kg⁻¹. Hydrolysoidun 3-MCPD-rasvahappoesterien LOD oli 100 µg kg⁻¹ ja LOQ 300 µg kg⁻¹.

Dioksolaanijohdokset

Meierhans ym. (1997) ja Rétho ja Blanchard (2007) määrittivät vapaata 3-MCPD:tä eri elintarvikkeista muodostamalla asetonin avulla haihtuvat dioksolaanijohdokset. Rétho ja Blanchard (2007) esikäsittelivät näytteet (paahtoleipä, juustot, keitot jne.) uuttamalla ne vedellä tai heptaanilla matriisista riippuen. Uuton jälkeen näytteet puhdistettiin käyttämällä kiinteäfaasiuuttoa (Extrelut NT20). Uuttamista tehostamaan näytteisiin lisättiin ennen uuttoa natriumkloridia. Uuton jälkeen näytteet haihdutettiin ja niihin lisättiin natriumsulfaattia. Tämän jälkeen näytteitä haihdutettiin huoneenlämmössä typpivirrassa päästämättä näytteitä kuivaksi asti. Näytteistä muodostettiin haihtuvat johdokset lisäämällä näytteeseen tolueeni-4-sulfonihappomonohydraatilla happamoitua kuivatettua asetonia. Johdosten muodostumisreaktio tapahtui 90 minuutin aikana 40 °C:n lämpötilassa. Jäähdytetty näyte laskettiin alumiinioksidipylvään läpi, jolloin näytteestä saatiin poistettua happokatalyyttinä toiminut *para*-tolueenisulfonihappo sekä mahdolliset epäpuhtaudet. Suodos analysoitiin GC-MS:llä. Sisäisenä standardina käytettiin 3-MCPD- d_5 :tä.

Käytetty menetelmä oli lineaarinen alueella 0,002-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Määritysraja (LOQ) oli kaikilla määritetyillä elintarvikkeilla alle 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Dioksolaanijohdosten muodostuminen estyy kokonaan, mikäli reaktiossa on mukana vettä. Jo 10 prosentin vesipitoisuus estää dioksolaanijohdosten syntymisen. Ongelma voidaan estää lisäämällä natriumsulfaattia etyyliasetaattiuutokseen ja käyttämällä sitä myös johdoksenmuodostusreaktiossa poistamassa reaktiossa syntyvää vettä (Rétho ja Blanchard 2005).

2.2.5 3-MCPD-mono- ja diesterien määrittäminen GC-MS:llä

3-MCPD rasvahappoestereitä on analysoitu esteröityneessä muodossa vain vähän eikä niille ole olemassa validoitua menetelmää. Yleisimmin menetelmät ovat perustuneet kloroesterien erottamiseen uutetusta rasvafraktiosta ohutlevykromatografian avulla, minkä jälkeen erotetut mono- ja diesterit on analysoitu GC-MS:llä ja kvantitoitu 3-MCPD-dipalmitaattina (Dávídek ym. 1980; Hamlet ja Sadd 2004; Zelinková ym. 2006). 3-MCPD-rasvahappoesterien vaihtelevat rasvahappoprofiilit tekevät menetelmästä hitaan ja siten rutiininkäyttöön turhan työlään menetelmän. Kloroesterien määrittäminen hankaloittaa myös kaupallisten vertailuaineiden puute.

Seefelder ym. (2007) syntetisoivat 3-MCPD mono- ja dipalmitaattiestereitä ja fraktioivat ne kromatografisesti aminopropyli-kiinteäfaasiuuttopylväiden avulla. Erotetut mono- ja diesterit hydrolysoitiin happohydrolyysin avulla ja niistä muodostettiin haihtuvat boronihappojohdokset, jotka määritettiin GC-MS:llä. Menetelmällä pystyttiin kartoittamaan 3-MCPD-mono- ja diesterien suhde erilaisissa kasviöljyseoksissa. Zelinková ym. (2008) erottivat maitorasvasta diesterit käyttämällä kromatografiseen erottumiseen silikageelikolonnia. Erotetut diesterit haihdutettiin kuiviin ja uutettiin tetrahydrofuraaniin, minkä jälkeen ne analysoitiin suoraan GC-MS:llä. Sisäisenä standardina menetelmässä käytettiin syntetisoitua 3-MCPD-d5-1,2-dipalmitaattia.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

Työn tausta ja tavoitteet

Maisterin tutkielman tavoitteena oli ottaa käyttöön Elintarviketurvallisuusvirastolle soveltuva 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämis menetelmä. Erityisesti tarkoituksena oli vertailla hydrolyysimenetelmien vaikutuksia 3-MCPD-rasvahappoesterien saantoon kvantitatiivisessa määrittäyksessä.

3.1 Materiaalit ja menetelmät

3.1.1 Koeasetelma

3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä valmistettiin esterisynteesin avulla. Syntetisoidut esterit hydrolysoitiin käyttämällä joko happohydrolyysiä tai natriummetoksidin avulla tapahtuvaa vaihtoesteröintiin perustuvaa hydrolyysiä.

Syntetisoitujen estereiden lisäksi käsiteltiin kaksi eri palmuöljynäytettä molemmilla hydrolyysimenetelmillä ja vertailtiin kaasukromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmällä saatuja analyysituloksia keskenään.

3.1.2 Koemateriaalit

Eri hydrolyysimenetelmien vertailussa näyttemateriaalina käytettiin sekä itse syntetisoituja 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä että kahta eri palmuöljyä. Palmuöljyn on kirjallisuudessa havaittu sisältävän analysoiduista öljyistä suurimpia pitoisuuksia 3-MCPD rasvahappoestereitä.

Palmuöljyt:

Unrefined Palm Oil, KTC Ltd. J.S. House, Moorcroft Drive, Wednesbury, WS10 7DE, UK, 500 ml, parasta ennen: tammikuu 2011.

Praise, Regular Palm Oil, 500 ml, Praise Export Services Ltd, Accra, Ghana, parasta ennen: joulukuu 2012.

Reagenssit

Työssä käytettiin seuraavia malliaineita, reagensseja ja laitteistoja:

Käytetyt malliaineet:

3-MCPD, 98 %, Aldrich Chemistry
 3-MCPD, 99,0 %, Dr.Ehrenstorfer GmbH
 3-MCPD-d5, 99 atom% D, 1,0 mg/ml, Chiron AS
 3-MCPD-d5, 98,7 atom % D, CDN Isotopes, Quebec, Canada

Esterien synteesissä käytetyt reagenssit ja laitteet:

3-MCPD, 98 %, Aldrich Chemistry
 3-MCPD-d5, 98,7 atom % D, CDN Isotopes, Quebec, Canada
 Palmityylikloridi, 98 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 4-dimetyyliaminopyridiini, ≥ 99 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
 Natriumkloridi; analyysilaatu, Merck, Darmstadt, Saksa
 Natriumvetykarbonaatti, NaHCO_3 , J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Natriumsulfaatti, J.T.Baker, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 2-propanoli, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Heksaani, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Dikloorimetaani, J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Dietyylieetteri, J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Suolahappo, 37 %, J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Milli-Q-vesi, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
 Bond Elut, NH2, 500 mg, 3 ml, Varian, Palo Alto, CA, USA

Happohydrolyysimenetelmässä käytetyt reagenssit:

Natriumkloridi; analyysilaatu, Merck, Darmstadt, Saksa
 Rikkihappo, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Metanoli, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Heksaani, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Asetoni, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Tetrahydrofuraani, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Fenyyliboronihappo, Fluka Analytical, Seelze, Saksa
 Milli-Q-vesi, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

Natriummetoksidimenetelmässä käytetyt reagenssit:

Fenyyliboronihappo, Fluka Analytical, Seelze, Saksa
 Natriummetylaatti, Sigma-Aldrich, St Louis, USA
 Etikkahappo, Fluka Analytical, Seelze, Saksa
 Natriumkloridi; analyysilaatu, Merck, Darmstadt, Saksa
t-butyyli-metyylieetteri, 99 %, Acros Organics, Geel, Belgium
 Etyyliasettaatti, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
 Milli-Q-vesi, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

Standardiliuosten valmistukseen käytetyt reagenssit:

3-MCPD, 98 %, Aldrich Chemistry, St. Louis, MO, USA
 3-MCPD-d5, 99 atom% D, 1,0 mg/ml, Chiron AS
 Milli-Q-vesi, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

Laitteet

Mittauslaitteistona analyyseissä käytettiin Hewlett Packardin 5890 –kaasukromatografilaitteistoa, johon on liitetty Hewlett Packardin 5971A -massaspektrometri sekä saman valmistajan 7673-kontrolleri. Lisäksi laitteistoon oli liitetty Hewlett Packardin 7673 -näytteesyöttäjä.

Yhdessä analyysissä käytettiin yllä mainitun GC-MS-laitteiston sijaan Hewlett Packardin 6890 -kaasukromatografia, johon oli liitetty Hewlett Packardin 5973 -massaspektrometri ja Agilent Technologiesin 7683 -injektori.

Kaasukromatografiseen erottumiseen käytettiin molemmissa laitteistoissa poolitonta HP-5MS kolonnia (30m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies)

Muut työssä käytetyt laitteet:

Analyysivaaka, Mettler PE 3500, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA

Ravisteleva vesihaude, Certomat WR, B.Braun, Melsungen, Saksa

Pyöröhaihdutin, Büchi 461 Rotavapor ja Büchi Rotavapor-R, Flawil, Sveitsi , molempiin pyöröhaihduttimiin liitettynä Vacuum controller V-850 (Büchi), vakuumpumppu (Büchi V-710)

Esikokeet

Työn alkuvaiheessa testattiin johdoksen muodostamista heptafluorobutyrianihydridillä. Kokeilussa huomattiin, että reagenssin rutiinikäyttö oli haastavaan sen vaatiman vedettömän ympäristön vuoksi. Tämä aiheutti hajontaa tuloksiin ja ongelmia syntyi erityisesti pienten pitoisuuksien kohdalla. Käytettäessä johdoksen muodostuksessa reagenssina fenyyliboronihiappoa vastaavia ongelmia ei esiintynyt.

3.1.3 Menetelmät

3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien synteesimenetelmä

Kaupallisten vertailuaineiden puuttumisesta johtuen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä valmistettiin itse hydrolyysien vertailua varten 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5 -vertailuaineista. Syntetisoitujen 3-MCPD-d5-palmitiiniestereiden avulla seurattiin sitä, käyttäytyykö isotooppileimattu 3-MCPD-d5-palmitiiniesteri hydrolyysissä samankaltaisesti kuin varsinainen isotooppileimaamaton yhdiste, jolloin 3-MCPD-d5-palmitiiniesteriä voitaisiin käyttää jatkossa menetelmässä sisäisenä standardina.

Esterisynteesi toistettiin yhteensä kolme kertaa (erät 1-3) ja jokaisella kerralla syntetisoitiin sekä 3-MCPD-palmitiiniestereitä että 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä. Kaikki syntetisoidut erät käsiteltiin jatkossa omina erillisinä erinä.

Esterien synteesimenetelmä perustuu Kraftin ym. (1975) kehittämään menetelmään ja siinä otettiin huomioon Seefelderin ym. (2007) ehdottamat muokkaukset menetelmään. 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien synteesi tehtiin alla olevan ohjeen mukaan käyttämällä 3-MCPD-vertailuaineen sijaan 200 mg 3-MCPD-d5-vertailuainetta.

3-MCPD-standardia punnittiin 200 mg:aa 250 ml:n lasipulloon ja liuotettiin 25 ml:aan dietyylieetteriä. Seos jäähdytettiin jäällä ja siihen lisättiin sekoittamalla 200 mg dimetyyliaminopyridiiniä.

Välittömästi dimetyyliaminopyridiinin liukenemisen jälkeen seokseen lisättiin koko ajan sekoittaen dietyylieetteriin liuotettua palmityylikloridia (443 mg). Lopuksi seokseen lisättiin vielä 50 ml dietyylieetteriä ja esteröitymisreaktion annettiin tapahtua huoneenlämmössä 12 tuntia.

Esteröitymisreaktion jälkeen liuos suodatettiin suodatinpaperin lävitse 250 ml:n erotussuppiloon ja suodatin pestiin kaksi kertaa 2 ml:lla dietyylieetteriä. Suodokset yhdistettiin ja lisättiin erotussuppiloon. Seos pestiin ensin 2 kertaa 40 ml:lla 1 N suolahappoa, joka oli jäähdytetty jäällä, seuraavaksi 2 kertaa 40 ml:lla kylläistä natriumvetykarbonaattiliuosta ja lopuksi vielä kaksi kertaa 40 ml:lla vettä.

Lopuksi orgaaninen faasi otettiin talteen, kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimella 40 °C:n lämpötilassa. Haihdutuksen jälkeen jäännös liuotettiin 2 ml:aan dikloorimetaania.

Näytteiden puhdistamiseen käytettiin viittä rinnakkaista aminopropyyli-kiinteäfaasiuuttopatruunaa. Patruunat pestiin ensin 4 ml:lla heksaania, minkä jälkeen pylväisiin lisättiin noin 400 µl näyttestä. Dikloorimetaani laskettiin läpi ja näyte eluoiitiin 4 ml:lla dikloorimetaanin ja 2-propanolin seosta (2:1). Eluaatti otettiin talteen kierrekorkillisiin koeputkiin ja haidutettiin kuivaksi typpivirrassa.

Erien 1 ja 2 eluaatit säilytettiin jääkaapissa ennen analyysiä. Erän 3 eluaatit liuotettiin haihdutuksen jälkeen pieneen määrään heksaania ja yhdistettiin 25 ml:n mittapullossa ja täytettiin merkkiin heksaanilla. Liuokset säilytettiin pimeässä huoneenlämmössä.

Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien määrittäminen eri hydrolyysimenetelmillä

Kaikki syntetisoidut erät (1-3) käsiteltiin sekä natriummetoksidihydrolyysiin perustuvalla standardimenetelmällä DGF C-III (09) (DGF, 2009) että happohydrolyysiin perustuvalla menetelmällä (Divinová ym. 2004; Zelinková ym. 2006).

Erien 1-2 eluaatit punnittiin koeputkiin siten, että kuhunkin koeputkeen punnittiin mahdollisimman tarkasti sama määrä sekä 3-MCPD-palmitiiniestereitä että 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä, minkä jälkeen puolet putkista käsiteltiin happohydrolyysimenetelmällä ja puolet natriummetoksidihydrolyysiin perustuvalla menetelmällä.

Erän 3 heksaaniin laimennettuja 3-MCPD-palmitiiniestereitä ja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä pipetoitiin kaikkiin koeputkiin 10 µl, minkä jälkeen puolet putkista (10 kpl) käsiteltiin happohydrolyysimenetelmällä ja puolet natriummetoksidihydrolyysiin perustuvalla menetelmällä.

Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien natriummetoksidihydrolyysiin perustuva määrittäminen

Menetelmänä käytettiin DGF-standardimenetelmää (2009), jossa 3-MCPD-rasvahappo-esterien määrittämisessä käytetään hydrolyysin reagenssina natriummetoksidia.

Syntetisoidut esterit liuotettiin 0,5 ml:aan *t*-butyyylimetyylieetterin ja etyyliasetaatin seosta (8:2), minkä jälkeen näytteisiin lisättiin 1 ml natriummetylaatti-liuosta (0,5 M). Koeputket suljettiin tiukasti ja hydrolyysin annettiin tapahtua 5-10 minuuttia.

Hydrolyysin jälkeen näytteisiin lisättiin 3 ml heksaania ja 3 ml etikkahapon ja 20-prosenttisen natriumkloridin liuosta, joka oli valmistettu liuottamalla 1 ml 99-prosenttista etikkahappoa 30 ml:aan 20-prosenttista natriumkloridiliuosta. Ylempi orgaaninen faasi poistettiin ja näytteisiin lisättiin 3 ml heksaania. Heksaanin lisäyksen jälkeen näytteitä ravisteltiin varovasti ja faasien annettiin erottua. Ylempi heksaanifaasi poistettiin ja näytteistä valmistettiin haihtuvat johdokset fenyyliboronihapolla ja analysoitiin GC-MS:llä.

Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien happohydrolyysiin perustuva määrittäminen

Käytetty menetelmä perustui Divinován ym. (2004) kehittämään happohydrolyysiin perustuvaan menetelmään ja siinä otettiin huomioon Zelinkován ym. (2007) ehdottamat muutokset.

Syntetisoidut esterit liuotettiin 1 ml:aan tetrahydrofuraania, minkä jälkeen näytteisiin lisättiin 1,8 ml rikkihapon metanoliliuosta (1,8 %). Putket suljettiin ja näytteet asetettiin 16 tunniksi vesihauteeseen 40 °C:n lämpötilaan. Hydrolyysin jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja niihin lisättiin 0,5 ml kylläistä natriumvetykarbonaattiliuosta. Tämän jälkeen näytteet haihdutettiin lähes kuiviin käyttämällä vakuumpipyöröhaihdutinta, jonka vesihauteen lämpötila oli säädetty 55 °C:n lämpötilaan. Haihdutetut näytteet liuotettiin 20-prosenttiseen natriumkloridi-vesiliuokseen ja näytteet pestiin 2 kertaa 2 ml:lla heksaania. Heksaanipesun jälkeen yhdisteistä muodostettiin haihtuvat johdokset fenyyliboronihapon avulla ja analysoitiin GC-MS:llä.

Palmuöljyn 3-MCPD-rasvahappoesterien natriummetoksidihydrolyysiin perustuva määrittäminen

Määrittämismenetelmänä käytettiin natriummetoksidihydrolyysiin perustuvaa DGF-standardimenetelmää (2009).

Palmuöljyä punnittiin 100 mg korkilliseen koeputkeen ja liuotettiin 0,5 ml:aan *t*-butyyylimetyylieetterin ja etyyliasetaatin seosta (8:2). Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin hydrolyysin onnistumisen tarkkailua varten 10 µl heksaaniin liuotettuja syntetisoituja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä, joiden pitoisuutta ei tunnettu. Lopuksi näytteisiin lisättiin vielä 1 ml natriummetylaatti-liuosta (0,5 M) ja koeputket suljettiin tiukasti ja hydrolyysin annettiin tapahtua 5-10 minuuttia.

Hydrolysoidut näytteet neutraloitiin ja käsiteltiin edelleen aiemmin kuvatussa 3-MCPD-palmitiiniesterien natriummetoksidimäärittämismenetelmän mukaisesti.

Palmuöljyn 3-MCPD-rasvahappoesterien happohydrolyysi-menetelmään perustuva määrittäminen

Käytetty menetelmä perustui Divinován ym. (2004) kehittämään menetelmään, Zelinkován ym. (2007) ehdottamiin muutoksiin.

Palmuöljynäytettä punnittiin 100 mg korkillisiin koeputkiin ja liuotettiin 1 ml tetrahydrofuraania. Näytteisiin lisättiin 10 µl heksaaniin liuotettuja syntetisoituja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä, joiden pitoisuutta ei tunnettu. Tämän jälkeen näytteet hydrolysoitiin ja niistä tehtiin haihtuvat johdokset, jotka määritettiin GC-MS:n avulla. Hydrolyysimenetelmä on kuvattu aiemmin 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien happohydrolyysimenetelmän kuvauksen yhteydessä.

Haihtuvien johdosten muodostaminen fenyyliboronihiapon avulla

Hydrolyysin avulla vapautetuista 3-MCPD:stä ja 3-MCPD-d5:stä sekä kalibrointiin käytetyistä 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-vertailuaineista muodostettiin haihtuvat johdokset Divinován ym. (2004) kehittämän menetelmän mukaan DGF-menetelmässä (2009) käytetyin muutoksin.

Haihtuvat johdokset muodostettiin lisäämällä näytteisiin 250 µl fenyyliboronihiappoliuosta. Fenyyliboronihiappoliuos oli valmistettu luottamalla 2 g fenyyliboronihiappoa 4 ml:aan vesi-asetoniliuosta (1:19). Putket suljettiin huolellisesti ja laitettiin vesihauteeseen 80 °C:n lämpötilaan 20 minuutiksi. Näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Jäähtyneisiin näytteisiin lisättiin 2 ml heksaania ja niitä ravisteltiin, jotta muodostuneet 4-kloorimetyyli-2-fenyyli-1,3,2-dioksaborolaanijohdokset saatiin siirtymään heksaanifaasiin. Noin 1 ml heksaania suodatettiin lasivillan lävitse sisäputkellisiin näytepulloihin ja analysoitiin GC-MS:llä.

Kaasukromatografisen-massaspektrometrinen määrittäminen (GC-MS)

Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d-palmitiiniesterien erien 1 ja 2 määritykset sekä palmuöljynäytteiden määritykset tehtiin käyttämällä Hewlett Packardin 5971A-massaspektrometriä, johon oli liitetty saman valmistajan 5890-kaasukromatografilaitteisto.

Analysoitaessa syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d-palmitiiniesterien erän 3 näytteitä käytettiin laitteistona Hewlett Packardin 5973 -massaspektrometriä ja 6890-kaasukromatografilaitteistoa toisen laitteiston hajoamisen vuoksi.

Kaasukromatografiseen erottumiseen käytettiin molemmissa laitteistoissa HP-5MS-kolonnia (30m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies, Foster City, CA, USA) Injektorin lämpötila pidettiin 250 °C:ssa (splitless). Kolonnin lämpötila oli kaikissa määrityksissä ohjelmoitu: 80 °C (1 min) -> 20 °C/min-> 190 °C -> 15 °C/min -> 280 °C (7 min). Kantokaasuna määrityksessä oli helium, virtausnopeudella 1 ml/min. Näytettä injektoidiin 1 µl. Ajonohjaus sekä tulosten käsittely tehtiin ChemStation-ohjelman avulla. Kvantitoinnissa käytettiin malliaineiden spektriajoja ja kirjallisuuden pohjalta

(Divinová ym. 2004) valittujen ionien monitorointia (SIM), monitoroidut ionit olivat m/z 47 (3-MCPD) ja m/z 150 (3-MCPD-d5). Lisäksi monitoroitiin ionit m/z 91 ja m/z 196 (3-MCPD) yhdisteiden tunnistamisen varmistamiseksi.

Kvantitatiivinen määrittäminen

3-MCPD:n pitoisuuksien määrittämiseen käytettiin ulkoisen standardin menetelmää. Standardiliuokset tehtiin laimentamalla 3-MCPD:n käyttöliuoksesta. Kantaliuos (1mg/ml) valmistettiin punnitsemalla 3-MCPD-malliainetta 100 mg ja liuottamalla 100 ml:aan 20-prosentista natriumkloridiliuosta. Kantaliuoksesta tehtiin käyttöliuos (10 µg/ml) laimentamalla se 20-prosenttiseen natriumkloridiliuokseen. Käyttöliuoksesta valmistettiin arvioidusta pitoisuusalueesta riippuen, välillä 0,08–10,0 µg ml⁻¹, viisi eri pitoisuutta ja niistä valmistettiin fenyyliboroniapon avulla haihtuvat johdokset, jotka analysoitiin GC-MS:llä. Kutakin pitoisuutta injektointiin kaksi kertaa jokaisen ajon aikana injektoiden ajon alussa yhden kerran ja ajon keskellä toisen kerran. Saaduista tuloksista piirrettiin kalibrointisuora pienimmän neliösumman menetelmällä. Standardiliuokset valmistettiin uudestaan jokaista analyysiä varten. Kanta- ja käyttöliuoksia säilytettiin pimeässä ja viileässä ja niistä otettiin vain kutakin käyttökertaa varten tarvittava määrä.

Menetelmän luotettavuus

Menetelmien toistettavuutta seurattiin valmistamalla näytteistä jokaisella analyysikerralla 3-10 rinnakkaista näytettä. Rinnakkaisten näytteiden tuloksia verrattiin keskenään ja niistä laskettiin pitoisuuksille keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Eri hydrolyysimenetelmillä saatujen tulosten eron merkittävyyttä analysoitiin t-testin avulla. Tilastollisiin analyyseihin käytettiin Statgraphics Plus –tilasto-ohjelmaa.

Syntetisoituihin esterinäytteisiin oli lisätty isotooppileimattua 3-MCPD-d5-palmitiiniesteriä, jotta voitaisiin seurata sen käyttäytymistä hydrolyysissä ja verrata sitä leimaamattoman 3-MCPD-palmitiiniesterin käyttäytymiseen.

Analysoitaessa syntetisoitujen 3-MCPD-palmitiiniestereiden saantoja eri hydrolyysimenetelmissä seurattiin näytteisiin lisättyjen syntetisoitujen 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien piikkien pinta-aloja rinnakkaisten näytteiden välillä.

Öljynäytteisiin lisättiin tunnettu määrä itse syntetisoitua 3-MCPD-d5 -palmitiiniesteriä ja hydrolysoituneen 3-MCPD-d5-isotooppistandardin piikkien pinta-aloja verrattiin 3-MCPD:n piikkien pinta-aloihin. Yhdisteiden piikkien pinta-alojen suhteiden avulla oli mahdollista seurata pitoisuuksien mahdollista suurenemista tai pienenemistä hydrolyysin aikana.

Menetelmän toteamisraja (LOD) määritettiin 3-MCPD-vertailuaineiden avulla käyttämällä sisäisenä standardina 3-MCPD-d5:tä. Toteamisraja määritettiin lisäämällä nollanäytteeseen useita eri pitoisuuksia ($0,02\text{--}0,08\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) 3-MCPD-vertailuainetta ja muodostamalla 3-MCPD:stä fenyyliboronihiapon avulla haihtuvat johdokset, jotka analysoitiin GC-MS:llä. Pitoisuudet laskettiin sisäisen standardin menetelmällä kalibrointisuoralta. Toteamisrajaksi määritettiin pienin pitoisuus, joka ylitti kromatogrammissa kolme kertaa nollanäytteen taustan kohinan. Määrittäminen toistettiin kolmena eri päivänä kolmena rinnakkaisena. Määrittämisraja (LOQ) laskettiin kertomalla toteamisraja kolmella.

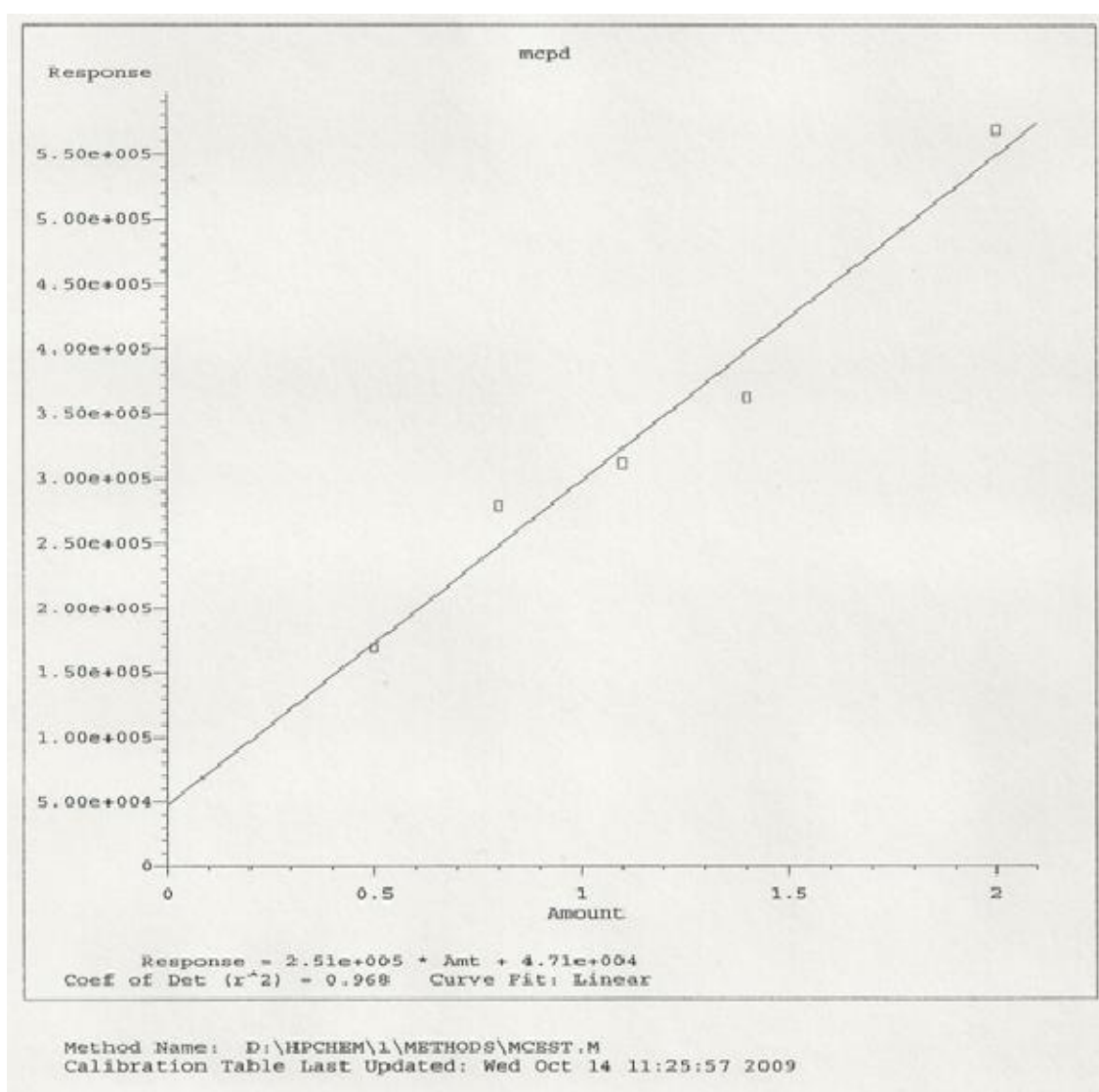
Menetelmän lineaarinen alue määritettiin 3-MCPD-vertailuaineiden avulla käyttämällä määrittämissä sisäisenä standardina 3-MCPD-d5:tä. Eri pitoisuuksista piirrettiin suora pienimmän neliösumman menetelmällä ja havaittiin menetelmän olevan öljynäytteillä lineaarinen $1,2\text{--}100\text{ mg kg}^{-1}$ välisellä alueella.

Syntetisoitujen 3-MCPD-palmitiiniesterien hydrolyysimenetelmiä verrattaessa valittiin kaikkiin rinnakkaisiin määrittäksiin saman synteesin homogeenoitu näyte. Pitoisuudet laskettiin ulkoisen standardin avulla punnittua määrää kohti ($\mu\text{g/mg}$) pitoisuuden ja piikinpinta-alan suhteen avulla.

3.2 Tulokset

3.2.1 Kvantitatiivisen määrittelyn tulokset

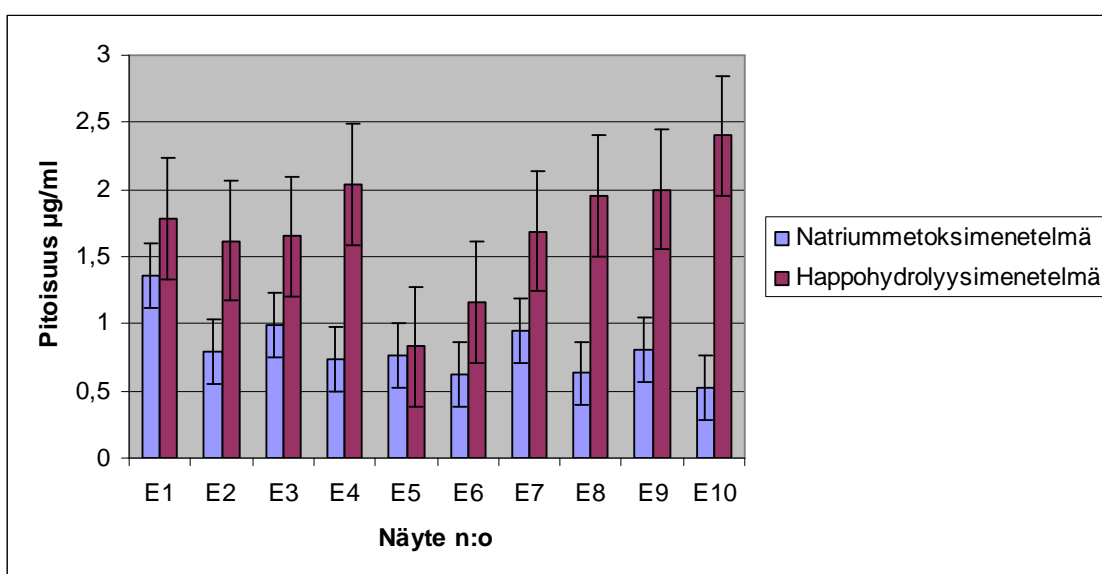
Menetelmän toteamisraja (LOD) oli 3-MCPD-vertailuaineella määritettynä $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ ja määrittäysraja (LOQ) $1200 \mu\text{g kg}^{-1}$ öljyä kohti. Menetelmä oli lineaarinen öljynäytteillä alueella $1,2\text{--}100 \text{ mg kg}^{-1}$. Pitoisuuden ja vasteen välistä riippuvuutta kuvaava korrelaatio-kerroin (r^2) vaihteli kalibrointisuorissa välillä $0,96\text{--}0,99$.



Kuva 7. 3-MCPD vertailuaineen kalibrointisuora pitoisuusalueella $0,5\text{--}2 \mu\text{g/ml}$.

3.2.2 Syntetisoiduista 3-MCPD-palmitiiniestereistä natriummetoksidi- menetelmällä ja happohydrolyysimenetelmällä mitatut tulokset

Yhteensä 20 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesteriä sisältävää näytettä analysoitiin käyttämällä 10 näytteeseen natriummetoksidimenetelmää ja 10 näytteeseen happohydrolyysimenetelmää. Kaikki näytteet sisälsivät 10 µl heksaaniin laimennettua 3-MCPD-palmitiiniesteriä ja 10 µl 3-MCPD-d5-palmitiiniesteriä, joiden pitoisuuksia ei tunnettu.



Kuva 8. 3-MCPD palmitiiniesterien (erä 3, n=10) pitoisuudet keskihajontoineen eri hydrolyysimenetelmillä määritettynä.

Happohydrolyysimenetelmällä käsiteltyjen näytteiden 3-MCPD:n pitoisuuksien havaittiin olevan merkittävästi natriummetoksidimenetelmällä saatuja tuloksia suuremmat (kuva 8). Natriummetoksidimenetelmällä saadut pitoisuudet olivat noin 48 % vastaavista happohydrolyysimenetelmällä määritetyistä pitoisuuksista ja ero oli tilastollisesti merkitsevä 95 %:n merkitsevyystasolla. Heksaaniin liuotettujen 3-MCPD-palmitiiniestereiden (erä 3) pitoisuus oli natriummetoksidimenetelmällä keskimäärin $0,82 \mu\text{g ml}^{-1}$ ja happohydrolyysimenetelmällä $1,71 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Taulukko 2 Heksaaniin laimennettujen 3-MCPD-palmitiiniestereiden (erä 3) pitoisuudet eri hydrolyysimenetelmien jälkeen vapaana 3-MCPD:nä mitattuna.

Hydrolyysimenetelmä	<i>n</i>	Keskiarvo µg/ml	Keskihajonta	Variaatiokerroin (%)
Natriummetoksimenetelmä	10	0,82	0,24	29
Happohydrolyysi	10	1,71	0,45	26

Menetelmien sisäisen hajonnan ja keskiarvon suhdetta kuvaava variaatiokerroin oli molemmissa hydrolyysimenetelmissä lähes sama noin 28 %. Toistettavuus menetelmissä oli siten ainoastaan tyydyttävä.

Heksaaniin liuotettujen 3-MCPD-palmitiiniesterien lisäksi määritettiin syntetisoitujen 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuus kahtena eri päivänä punnitsemalla syntetisoitua esterä suoraan koeputkiin, minkä jälkeen näytteet käsiteltiin molemmilla hydrolyysimenetelmillä.

Natriummetoksidimenetelmää käytettäessä olivat pitoisuudet noin 40 ja 47 % vastaavasta happohydrolyysimenetelmällä määritetystä pitoisuudesta (taulukot 3 ja 4).

Taulukko 3. 3-MCPD-palmitiiniestereistä (erä 1) hydrolysoidun 3-MCPD:n pitoisuudet GC-MS:llä määritettynä

Hydrolyysimenetelmä	<i>n</i>	Keskiarvo µg/mg	Keskihajonta	Variaatiokerroin (%)
Natriummetoksimenetelmä	3	8,7	1,9	21
Happohydrolyysi	3	22	1,8	8

Taulukko 4. 5 3-MCPD-palmitiiniestereistä (erä 2) hydrolysoidun 3-MCPD:n pitoisuudet GC-MS:llä määritettynä

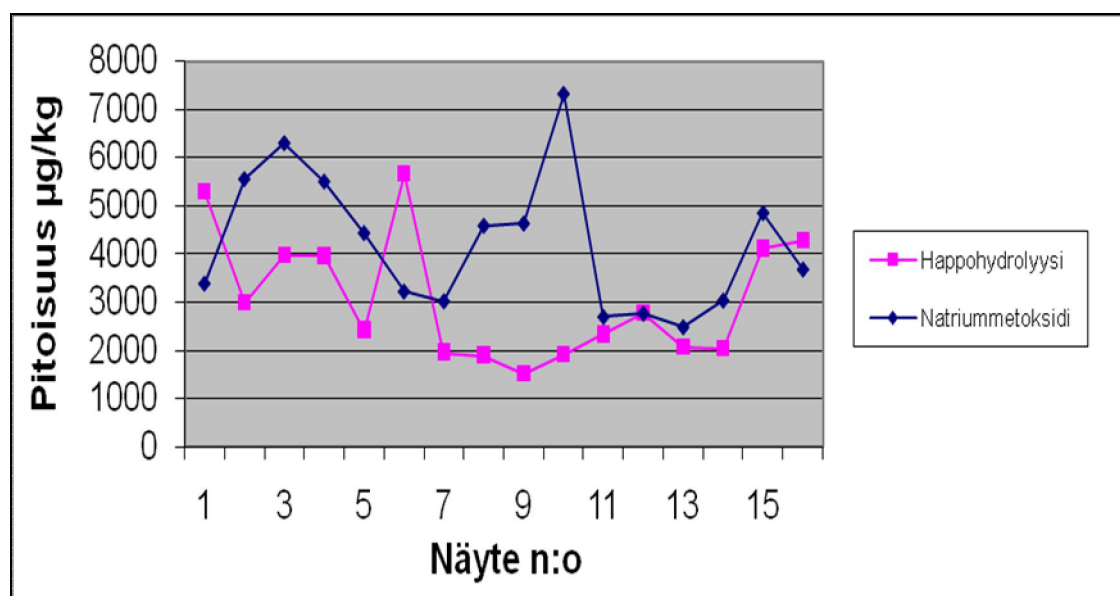
Hydrolyysimenetelmä	<i>n</i>	Keskiarvo µg/mg	Keskihajonta	Variaatiokerroin (%)
Natriummetoksimenetelmä	6	30,9	10	32
Happohydrolyysi	6	65,2	8,1	13

Verrattaessa keskenään eri hydrolyysimenetelmien vaikutusta mitattuihin pitoisuuksiin oli näiden keskiarvojen välinen ero merkittävä 95 %:n merkitsevyystasolla. Keskihajonta oli natriummetoksidimenetelmässä suurempi, variaatiokertoimen ollessa 21 ja 32 %, kun se happohydrolyysimenetelmällä saaduissa tuloksissa oli vain noin 8 ja 13 %.

3-MCPD-d5-palmitiiniesterien pitoisuuksia ei laskettu vaan kaasukromatogrammien piikkien pinta-aloja verrattiin keskenään. Vertailussa havaittiin 3-MCPD-d5 palmitiiniesterien käyttäytyvän molemmissa hydrolyysimenetelmissä samoin kuin 3-MCPD-palmitiiniesterit. 3-MCPD-d5:n piikkien pinta-alat olivat happohydrolyysimenetelmässä merkittävästi suuremmat kuin vastaavat natriummetoksidimenetelmällä käsitellyn 3-MCPD-d5:n piikkien pinta-alat (liite 1).

3.2.3 Öljynäytteistä natriummetoksidimenetelmällä ja happohydrolyysimenetelmällä mitatut tulokset

Kaksi eri palmuöljynäytettä käsiteltiin kolmena eri päivänä natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmillä kuutena rinnakkaisena. Praise -palmuöljyn 3-MCPD:n pitoisuudet jäivät alle määritysrajan ($1200 \mu\text{g kg}^{-1}$) ja tulosvertailuun käytettiin KTC:n puhdistamattomasta palmuöljystä mitattuja 3-MCPD:n kokonaispitoisuuksia (kuva 9).



Kuva 9. Vapaan ja hydrolysoidun 3-MCPD:n pitoisuudet KTC-palmuöljynäytteissä eri hydrolyysimenetelmien jälkeen GC-MS:llä määritettynä. Näytteet nro 1–6, 7–12 ja 13–16 edustavat kolmen eri päivän rinnakkaisia mittaustuloksia.

3-MCPD:n pitoisuus KTC-palmuöljyssä natriummetoksidin avulla tehdyn hydrolyysin jälkeen oli keskimäärin $4100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ja happohydrolyysin jälkeen $3100 \mu\text{g kg}^{-1}$ öljyä kohti. Keskiarvo koostui kolmena eri päivänä mitattujen tulosten yhteenlasketusta keskiarvosta.

Verrattaessa pitoisuuksia keskenään havaittiin, ettei palmuöljynäytteiden kohdalla eri hydrolyysimenetelmillä saatujen tulosten välillä ollut tilastollisesti merkittävää eroa, keskiarvojen poiketessa toisistaan vain 24 %. Kuvasta 9 on kuitenkin havaittavissa sekä päivien sisällä olevaa että päivien välistä vaihtelua.

Taulukko 6. KTC -palmuöljynäytteiden 3-MCP- pitoisuudet GC-MS:llä määritettynä.

Hydrolyysimenetelmä	<i>n</i>	Pitoisuus µg kg ⁻¹	Keski- hajonta	Variaatio- kerroin, %	Vaihteluväli, µg kg ⁻¹
Natriummetoksidi, 5.10.2009	5	5043	1135	23	3396-6306
Happohydrolyysi, 5.10.2009	6	3801	1234	32	2416-5660
Natriummetoksidi, 7.10.2009	7	4179	1774	42	2705-4642
Happohydrolyysi, 7.10.2009	6	2707	675	25	1521-2781
Natriummetoksidi, 8.10.2009	5	4866	257	5	2495-4857
Happohydrolyysi, 8.10.2009	5	3781	3781	69	2073-4287

Natriummetoksidimenetelmässä variaatiokerroin vaihteli päivästä riippuen 23 ja 42 %:n välillä (taulukko 6). Happohydrolyysimenetelmän variaatiokerroin vaihteli 21 ja 40 %:n välillä. Menetelmien suhteelliset keskihajonnat vaihtelivat päivien välillä siten merkittävästi.

3.3 Pohdinta

Tutkimuksen kokeellisen osan tarkoituksena oli ottaa Elintarviketurvallisuusvirastossa käyttöön 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämiseen soveltuva menetelmä, jolla voitaisiin määrittää 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuuksia elintarvikkeista ja erityisesti kasviöljyistä.

Tällä hetkellä 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittystä varten ei ole olemassa virallisia standardimenetelmiä eikä niiden pitoisuuksia ole kartoitettu kuin suppeasta joukosta elintarvikkeita. Suurimmat 3-MCPD-rasvahappoesterien pitoisuudet on mitattu raffinoituista kasviöljyistä ja erityisesti palmuöljyistä.

Käytetyimmät analyysimenetelmät perustuvat 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämiseen hydrolyysin jälkeen vapaana 3-MCPD:nä. Pääasiassa määrittämisessä on käytetty hydrolyysimenetelmänä happohydrolyysiä. Natriummetoksidia hydrolyysin reagenssina käyttäneen Weißhaarin (2008) mukaan rikkihapon ja metanolin avulla tehdyssä happohydrolyysimenetelmässä saattaa muodostua ylimääräistä 3-MCPD:tä analyysin aikana. Väite perustuu tunnettuun reaktioon, jossa glyseroli reagoi happamissa olosuhteissa, korkeassa lämpötilassa, kloridi-ionien kanssa muodostaen 3-MCPD:tä. Toisaalta natriummetoksidimenetelmän emäksisissä olosuhteissa 3-MCPD:n kloridi ja sen viereinen hydroksyyli-ryhmä reagoivat keskenään muodostaen substituoidun oksiraanin, jonka seurauksena 3-MCPD hajoaa (Zelinková ym. 2009).

Valittaessa 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämiseen sopivaa menetelmää päätettiin vertailla näitä kahta hydrolyysimenetelmää keskenään ja valita sopiva määrittäminen menetelmä saatujen tulosten pohjalta.

Haastetta 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämiseen toi esterimuotoisten vertailuaineiden puuttuminen. Analyysimenetelmissä sisäisenä standardina on pääasiassa käytetty vapaata 3-MCPD-d5:tä, joka on lisätty näytteisiin joko ennen tai jälkeen hydrolyysin. Tällöin voidaan kerätä ainoastaan tietoa siitä, kuinka yhdiste on selviytynyt eri analyysivaiheista ja sulkea pois menetelmästä aiheutuvat erot rinnakkaisten näytteiden välillä, mutta esimerkiksi hydrolysoitumisasteesta ei saada tarkkaa tietoa.

Vertailuaineiden puuttumisen vuoksi 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-rasvahappestereitä syntetisoitiin itse, minkä jälkeen ne käsiteltiin molemmilla hydrolyysimenetelmillä mahdollisten menetelmien välisten erojen selvittämiseksi. Käyttämällä lähtöaineina syntetisoituja 3-MCPD-rasvahappestereitä voitiin sulkea pois mahdollinen 3-MCPD:n muodostuminen hydrolyysin aikana reaktioon tarvittavan glyserolin puuttumisen vuoksi.

3-MCPD:n mahdollista muodostumista hydrolyysin aikana tarkasteltiin käyttämällä näyttemateriaalina palmuöljyä. Kasviöljyt sisältävät glyserolia, joka voi toimia lähtöaineena 3-MCPD:n muodostumisessa hydrolyysin aikana. Weißhaar (2008) mukaan kloridi-ioneja saattaa esiintyä analyysiin käytetyissä laboratoriovälineissä kontaminaationa, mahdollistaen siten 3-MCPD:n muodostumisen glyserolin ja kloridi-ionien välisessä reaktiossa hydrolyysin aikana.

Kvantitatiivista analyysia varten määritettiin menetelmille toteamis- ja määritysrajat 800 µg/kg ja 1200 µg/kg kiloa öljyä kohti. Käytetyn mittauslaitteiston herkkyys ei ollut riittävä, jotta määrittelyissä olisi päästy kirjallisuudessa aiemmin kyseisillä menetelmillä ilmoitettuihin rajoihin 100 µg/kg (LOD) ja 300 µg/kg (LOQ) kiloa öljyä kohti (Zelinková, 2006). 3-MCPD-rasvahappestereiden pitoisuuksille ei ole asetettu valvontarajaa, joka asettaisi vaateita menetelmän toteamis- ja määrittäysrajoille.

3.3.1 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien synteesi

3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterit syntetisoitiin kirjallisuudessa yleisimmin käytetyllä menetelmällä (Kraft ym. 1979). Synteesi sisältää useita eri työvaiheita, jotka saattavat vaikuttaa syntetisoitujen esterien saantoon. Tämän vuoksi ainoastaan saman synteiesierän homogenoituja näytteitä oli järkevää käyttää rinnakkaisiin analyysihin, eikä mitattuja pitoisuuksia siten ollut järkevää verrata suoraan toisiinsa vaan pikemminkin vertailla eri hydrolyysimenetelmin mitattujen tulosten suhteita keskenään. Tulosten oikeellisuuden tarkastelua vaikeutti osaltaan se, ettei syntetisoitujen esterien pitoisuuksia pystytty tämän tutkimuksen puitteissa mittaamaan suoraan ilman hydrolysointia ja johdosten muodostamista.

Uuttamalla syntetisoidut esterit heksaaniin pystyttiin mahdollisesti parantamaan näytteiden homogeneisyyttä, minkä lisäksi näytteen jakaminen rinnakkaisiin näytteisiin oli helpompaa pipetoimalla kuin punnitsemalla, sillä synteesistä saatua kiinteää 3-MCPD-

palmitiiniesteriä oli määrällisesti vähän ja sitä oli hankala käsitellä punnitsemisen yhteydessä.

Synteesimenetelmä oli käytössä yksinkertainen ja melko nopea suorittaa. Menetelmän avulla voidaan jatkossakin syntetisoida 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittäminen menetelmän jatkokehitystä varten. Jatkossa olisi mielekäästä kehittää menetelmä syntetisoitujen esterien pitoisuuksien suoraan mittaamiseen GC-MS:llä ilman hydrolyysiä ja johdosten muodostamista.

3.3.2 Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien määrittäminen natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmillä

Syntetisoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien saantoja eri hydrolyysimenetelmillä verrattiin keskenään. Vertailuun käytettiin hydrolysoituneen 3-MCPD:n pitoisuuksia, jotka määritettiin kaasukromatogrammin piikin pinta-alan mukaan ulkoista standardia vasten. Hydrolysoituneen 3-MCPD-d5:n pitoisuuksia ei laskettu vaan ainoastaan piikkien pinta-aloja seurattiin ja niiden pohjalta arvioitiin 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien käyttäytymistä hydrolyyseissä.

Syntetisoitujen 3-MCPD-palmitiiniesterien kohdalla eri hydrolyysimenetelmillä saaduilla tuloksilla oli tilastollisesti merkittävä ero. Natriummetoksidimenetelmällä 3-MCPD:n saannot olivat odotetusti happohydrolyysimenetelmän vastaavia tuloksia keskimäärin pienemmät. Natriummetoksidimenetelmän saannot olivat keskimäärin 45 % happohydrolyysin vastaavista saannoista. Weißhaar (2008) käytti hydrolyysimenetelmien välisessä vertailussa neitsyt-oliiviöljyä ja puhdistettua oliiviöljyä jolloin 3-MCPD:n saannot olivat natriummetoksidimenetelmää käytettäessä noin 80 ja 20 % hydrolyysimenetelmän saannoista.

Tässä tutkimuksessa saatujen tuloksen oikeellisuutta ei pystytty varmistamaan sillä syntetisoitujen esterien pitoisuuksia ennen analyysiä ei tunnettu. Seefelder ym. (2008) syntetisoivat samalla menetelmällä 3-MCPD-palmitiiniestereitä ja erottelivat ne kromatografisesti edelleen mono- ja diestereiksi. 3-MCPD mono- ja diesterien saanto synteesistä oli tuolloin ilman hydrolyysiä suoraan analysoituna yhteensä 40 mg. Tässä tutkimuksessa käytettyjä laimennoksia käyttäen olisi 3-MCPD:n pitoisuus GC-MS:llä

analysoituna arviolta noin $2,6 \mu\text{g ml}^{-1}$. Tämä tulos on hyvin linjassa heksaaniin laimennettujen syntetisoitujen happohydrolyysimenetelmällä mitattujen tulosten keskiarvon kanssa ($1,71 \mu\text{g ml}^{-1}$) ja siten voidaan olettaa happohydrolyysimenetelmällä saavutetun tuloksen olevan suuruusluokassaan oikea.

Saatujen tulosten pohjalta voidaan päätellä, että happohydrolyysimenetelmä hydrolysoi 3-MCPD-palmitiiniestereitä 3-MCPD:ksi natriummetoksidimenetelmää paremmin. Lisäksi on mahdollista, että natriummetoksidimenetelmässä osa 3-MCPD:stä hajosi hydrolyysin aikana mahdollisen oksiraanien muodostumisreaktion kautta (Weißhaar 2008; Zelinková ym. 2009). Happohydrolysoidun 3-MCPD:n suurempi saanto 3-MCPD-palmitiiniestereistä ei tässä tapauksessa voi johtua ylimääräisen 3-MCPD:n muodostumisesta happohydrolyysin aikana, koska reaktiossa ei ole läsnä muodostumiseen tarvittavaa glyserolia.

Tulosten välinen hajonta oli melko suurta (8–32 %) molemmilla menetelmillä, mikä saattaa johtua menetelmien monivaiheisuudesta. Hydrolyysin aikana on mahdollista, etteivät yhdisteet hydrolysoitu jokaisen näytteen kohdalla täydellisesti. Tämän lisäksi hajontaa tuloksiin voi tuoda haihtuvien johdosten muodostumisreaktion epätäydellinen onnistuminen analyysissä.

Syntetisoitujen 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien havaittiin käyttäytyvän hydrolyyiseissä syntetisoitujen 3-MCPD-palmitiiniesterien kaltaisesti. 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien piikkien pinta-alat olivat natriummetoksidimenetelmällä kaikissa tapauksissa pienempiä kuin happohydrolyysillä käsiteltyjen näytteiden piikkien pinta-alat. Tästä voidaan päätellä, että isotooppileimatut syntetisoidut esterit hydrolysoituvat huomattavasti nopeammin käytettäessä natriummetoksidimenetelmää ja/tai ne osittain hajoavat hydrolyysin aikana käytettäessä happohydrolyysimenetelmänä natriummetoksidimenetelmää. Weißhaarin (2008) mukaan sisäisenä standardina käytetystä 3-MCPD-d5:stä noin 20–60 % hajosi käytettäessä analyysimenetelmänä natriummetoksidimenetelmää.

Tämän tuloksen pohjalta voidaan päätellä, että 3-MCPD-d5-vertailumateriaalia voidaan käyttää sisäisenä standardina molemmissa hydrolyysimenetelmissä ja siten korjata mahdollisia saantovirheitä. Sisäinen standardi tulee tällöin lisätä näytteisiin ennen hydrolyysivaihetta.

3.3.3 Palmuöljynäytteiden määrittäminen natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmillä

Weißhaar (2008) osoitti, että happohydrolyysimenetelmässä saattaa syntyä 3-MCPD:tä, mikäli mukana on ylimäärä kloridi-ioneja. Kun neitsyt-oliiviöljynäytteisiin lisättiin 1 % natriumkloridiliuosta oli happohydrolyysin jälkeinen 3-MCPD:n saanto noin 2000 kertaa suurempi kuin käytettäessä natriummetoksidimenetelmää. Vertaillessaan natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmien vaikutusta 3-MCPD:n pitoisuuksiin öljynäytteissä, joihin ei lisätty ylimäärää natriumkloridia, olivat 3-MCPD:n pitoisuudet tällöin noin 1-5 kertaa suurempia käytettäessä happohydrolyysimenetelmää. Weißhaar (2008) epäili happohydrolyysimenetelmässä muodostuvan ylimääräistä 3-MCPD:tä glyserolin ja kloridi-ionien välisessä reaktiossa. Kasviöljyt sisältävät glyserolia ja kloridi-ionien hän uskoi kulkeutuneen näytteisiin joko kontaminoituneiden laboratoriovälineiden tai analysoitavan öljynäytteen mukana. Kasviöljyihin saattaa myös niiden puhdistuksessa käytettävän valkaisuvaiheen jäljiltä jäädä kloridi-ioneja.

Tässä tutkimuksessa KTC-palmuöljynäytteiden kohdalla ero oli yllättäen päinvastainen saantojen ollessa suurempia natriummetoksidimenetelmää käytettäessä eikä ylimääräisen 3-MCPD:n muodostumista öljynäytteissä happohydrolyysin aikana havaittu. Natriummetoksidimenetelmässä 3-MCPD:n pitoisuus oli keskimäärin $4100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ja happohydrolyysimenetelmässä keskimäärin $3100 \mu\text{g kg}^{-1}$ öljyä kohti. Pitoisuuksilla ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa. Puhdistetuista palmuöljyistä on mitattu keskimäärin $600\text{--}4000 \mu\text{g kg}^{-1}$ pitoisuuksia (Karsulinova ym. 2007; Zelinková ym., 2009). Tässä tutkimuksessa käytetyt palmuöljyt olivat puhdistamattomia, missä tapauksessa niiden pitoisuuksien oletettaisiin olevan huomattavasti pienempiä kuin nyt mitatut pitoisuudet.

KTC-palmuöljystä mitattujen tulosten variaatiokerroin oli suuri (5–69 %), mistä syystä saatuihin tuloksiin on syytä suhtautua varauksella. Öljynäytteiden analysoinnissa käytetty GC-MS-laitteisto meni määrittysten aikana epäkuntoon eikä analyysiä voitu enää jatkaa. Saatuja tuloksia ei siten pystytty varmentamaan useammilla toistokokeilla.

Puhdistamattoman Praise-palmuöljyn pitoisuudet jäivät molemmissa menetelmissä alle määrittämissä rajan. Tästä voidaan päätellä, ettei happohydrolyysin aikana syntynyt ylimääräistä 3-MCPD:tä ainakaan merkittäviä määriä. On myös mahdollista, etteivät

näytemateriaalina käytetyt öljyt sisältäneet riittävästi 3-MCPD:n muodostumisreaktioon tarvittavia lähtöaineita.

Molempiin öljynäytteisiin oli lisätty tunnettu määrä heksaaniin uutettuja 3-MCPD-d5-palmitiiniestereitä, joiden kaasukromatogrammien piikkien pinta-alojen seurattiin. Piikkien pinta-alat vaihtelivat suuresti saman analyysin aikana ja erot isotooppileimatun ja leimaamattoman 3-MCPD:n piikkien pinta-aloissa olivat suuria jopa saman näytteen sisällä. Erot eivät siten johtuneet analyysin aikana tapahtuneesta hävikistä vaan todennäköisesti mittauslaitteiston herkkyyden vaihtelusta ajon aikana. Laitteiston toimivuutta olisi pitänyt seurata erillisellä, analysoitavan näytteen kaltaisella yhdisteellä.

Molempien määritysmenetelmien monivaiheisuus lisää omalta osaltaan erilaisten satunnaisvirheiden mahdollisuutta. Näytteiden käsittelyissä pyrittiin ottamaan huomioon erityisesti toistotarkkuus ja ne suoritettiin aina täysin samalla tavalla. Mahdollisia virhelähteitä analyysiin tuovat käytetyt hydrolyysimenetelmät sekä haihtuvien johdosten muodostaminen. Tämän vuoksi on tärkeää jatkossakin analysoida useita rinnakkaisnäytteitä sekä käyttää analyyseissä mukana sisäistä standardia.

3.3.4 Natriummetoksidi- ja happohydrolyysimenetelmien käytön vertailu

Natriummetoksidimenetelmä oli analyysimenetelmänä huomattavasti nopeampi suorittaa kuin happohydrolyysimenetelmä tämän vaativan 16 tunnin hydrolyysiajan vuoksi. Käytännössä näin pitkä hydrolyysiaika on hankala sovittaa työpäivään ja analyysi kestää aina vähintään kaksi päivää. Happohydrolyysimenetelmän kestoa lisää myös näytteiden sisältämän veden haihduttamiseen menevä aika.

Natriummetoksidimenetelmä mahdollisesti hajottaa 3-MCPD:tä ja 3-MCPD-d5:tä hydrolyysin aikana, minkä vuoksi on tärkeää käyttää analyysissä sisäisenä standardina 3-MCPD-d5:tä. Tällöin voidaan seurata mahdollista hävikkiä ja korjata saantoja korjauslaskennan avulla.

4 PÄÄTELMÄT

Tämän työn tavoitteeksi oli asetettu 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämenetelmäksi soveltuvan menetelmän käyttöön ottaminen Elintarviketurvallisuusvirastossa. Tähän tavoitteeseen ei aivan tämän työn puitteissa päästy käytetyn GC-MS-laitteiston hajoamisen vuoksi.

Tällä tutkimuksella voitiin kuitenkin osoittaa, että käytetyissä hydrolyysimenetelmissä on eroa 3-MCPD-rasvahappoesterien saannon suhteen, mikä tulee huomioida menetelmän valintaa tehdessä. Käytettäessä näytemateriaalina syntetisoituja 3-MCPD-palmitiiniestereitä olivat saannot natriummetoksidimenetelmällä merkittävästi pienempiä happohydrolyysimenetelmän vastaaviin tuloksiin verrattuna. Erot saannoissa eivät johtuneet mahdollisesta 3-MCPD:n muodostumisesta happohydrolyysin aikana. Erot johtuvat todennäköisesti joko happohydrolyysimenetelmän paremmasta hydrolyysitehosta tai siitä, että 3-MCPD hajoaa natriummetoksidimenetelmän aikana. Saatujen tulosten melko suureen hajontaan tulee myös kiinnittää huomiota ja jatkossa arvioida tarkasti mahdollisia virhelähteitä.

Tässä työssä ei havaittu 3-MCPD:n mahdollista syntymistä öljynäytteissä happohydrolyysin aikana vaan saadut tulokset osoittivat päinvastaista. Natriummetoksidimenetelmällä 3-MCPD:n saannot olivat öljynäytteiden kohdalla suurempia kuin vastaavat happohydrolyysillä saadut 3-MCPD:n saannot. Tulosten hajonta oli tässä tapauksessa kuitenkin syntetisoitujen esterien hajontojakin suurempaa, minkä lisäksi laitteisto hajosi viimeisen analyysin jälkeen ja on siten todennäköisesti vaikuttanut aiemmin saatuihin tuloksiin. Tästä johtuen analyysit öljynäytteillä tulisi tehdä uudestaan tulosten varmentamiseksi.

Molemmat käytetyt hydrolyysimenetelmät osoittautuivat käyttökelpoisiksi menetelmiksi 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittäksessä ja niistä kumpi tahansa voitaisiin validoinnin jälkeen ottaa käyttöön 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittämenetelmäksi Evirassa. Tällä hetkellä menetelmien mittausepävarmuus ei ole riittävän pieni, jotta menetelmiä voitaisiin käyttää mahdollisen pitoisuusrajan valvontaan.

Natriummetoksidi -menetelmä osoittautui rutiinikäytössä huomattavasti nopeammaksi suorittaa sen merkittävästi lyhyemmän hydrolyysiajan ansiosta. 3-MCPD:n mahdollisen hajoamisen vuoksi on natriummetoksidi -menetelmää käytettäessä erittäin tärkeää käyttää analyysissä sisäisenä standardina 3-MCPD-d5:tä, joka käyttäytyy analyysissä 3-MCPD:n tavoin. Tämä mahdollistaa saantojen korjauslaskennan mahdollisen hävikin kohdalla.

Tulevaisuudessa 3-MCPD-rasvahappoesterien mono- ja diesterien suhde saattaa nousta esterien kokonaispitoisuutta merkittävämmäksi määrittäyskriteeriksi, mikäli monoesterien mahdollisesta haitallisuudesta ihmisille saadaan lisää tutkimustuloksia. Myös natriumkloridin käyttö kaikissa 3-MCPD-rasvahappoesterien määrittäysmenetelmissä tulee ottaa kriittiseen tarkasteluun, sillä öljyjen sisältämä glysidoli sekä sen rasvahappoihin esteröityneet muodot voivat reagoida analyysin aikana kloridi-ionien kanssa muodostaen 3-MCPD:tä ja siten aiheuttaen virhettä öljynäytteiden 3-MCPD:n pitoisuusmittauksiin.

LÄHDELUETTELO

- BfR, Federal Institute for Risk Assessment. 2009. Initial evaluation of the assessment of levels of glycidol fatty acid esters detected in refined vegetable fats. BfR Opinion No. 007/2009. Saatavilla: http://www.bfr.bund.de/cm/245/initial_evaluation_of_the_assessment_of_levels_of_glycidol_fatty_acid_esters.pdf. Tulostettu: 3.11.2009.
- Breitling-Utzmann CM, Hrenn H, Haase N U, Unbehend GM, 2005, Influence of dough ingredients on 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) formation in toast. *Food Additives and Contaminants* 22(2):97-103.
- Calta P, Velíšek J, Doležal M, Hasnip S, Crews C, Réblová Z, 2004, Formation of 3-chloropropane-1,2-diol in systems simulating processed foods. *European Food Research and Technology* 218(6):501-506.
- Cao X, Song G, Gao Y, Zhao J, Zhang M, Wu W, Hu Y. 2009. A Novel derivatization Method Coupled with GC-MS for the Simultaneous Determination of Chloropropanols. *Chromatographia* 70:661-664.
- Collier PD, Cromie DDO, Davies AP, 1991, Mechanism of formation of chloropropanols present in protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68(10):785-790.
- Dayrit FM, Ninonuevo MR. 2004. Development of an analytical method for 3-monochloropropane-1,2-diol in soy sauce using 4-heptanone as derivatizing agent. *Food additives and contaminants* 21(3):204.
- DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft. 2009. Ester-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD esters) and 3-MCPD forming substances. Determination in fats and oils by GC-MS. *Standard Methods C-III* 18(09).
- Divinova V, Svejkovska B, Doležal M, Velisek J. 2004. Determination of free and bound 3-chloropropane-1,2-diol by gas chromatography with mass spectrometric detection using deuterated 3-chloropropane-1,2-diol as internal standard. *Czech journal of food science* 22(5):182.
- Divinova V, Doležal M, Velisek J. 2007. Free and bound 3-Chloropropane-1,2-diol in Coffee Surrogates and Malts. *Czech J. Food Sci.* 25:39-47.
- Doležal M, Chaloupská M, Divinová M, Svejkovská B, Velíšek J, 2005, Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol and its esters in coffee. *European Food Research and Technology* 221:221-225.
- Doležal M, Kertisová J, Zelinková Z, Velíšek J. 2009. Analysis of Bread Lipids for 3-MCPD Esters. *Czech J. Food Sci.* 27. Special Issue: 417-420.
- European Commission (2001) Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (OJ L 77 16.3.2001, p12).
- Franke K, Strijowski U, Fleck G, Pudiel F. 2009. Influence of chemical refining process and oil type on bound 3-chloro-1,2-propanediol contents in palm oil and rapeseed oil. *LWT - Food Science and Technology* 42(10):1751-4.
- Hamlet CG. 1998. Analytical methods for the determination of 3-chloro-1,2-propanediol and 2-chloro-1,3-propanediol in hydrolysed vegetable protein, seasonings and food products using gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Food additives and contaminants* 451.
- Hamlet CG, Sadd PA, Gray DA. 2003. Influence of composition, moisture, pH and temperature on the formation and decay kinetics of monochloropropanediols in wheat flour dough. *Eur Food Res Technol* 216:122-128.

Hamlet CG, Sadd PA. 2004. Chloropropanols and their esters in cereal products. Czech J. Food Sci. 22. Special Issue; 259-262.

Hamlet CG, Sadd PA, Gray DA. 2004a. Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 1. Leavened doughs. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:2059-2066.

Hamlet CG, Sadd PA, Gray DA. 2004b. Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 2. Unleavened doughs. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:2067-2072.

Hamlet CG, Sadd PA. 2005. Effects of yeast stress and pH on 3-monochloropropanediol (3-MCPD)-producing reactions in model dough systems. Food Addit Contam 22(7):616-23.

Hamlet CG. 2008. Chloropropanols and their Fatty Acid Esters. Teoksessa: Gilbert J, Senyuva HZ toim. Bioactive Compounds in Foods. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. 323-357

Hoydonckx HE, De Vos DE, Chavan SA, Jacobs PA, Hoydonckx HE, De Vos DE, Chavan SA, Jacobs PA. 2004. Esterification and Transesterification of Renewable Chemicals. Topics in Catalysis 27(1-4):83.

JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2006. Summary and Conclusions from the Sixty-seventh Meeting, Rome 20-29 June. JECFA67/SC.

Karsulinova L, Folprechtova B, Dolezal M, Dostalova J, Velisek J. 2007. Analysis of the lipid fractions of coffee creamers, cream aerosols, and bouillon cubes for their health risk associated constituents. Czech journal of food science 25(5):257.

Kraft R, Brachwitz H, Langen P, Zöpfel HJ. 1979. Halogenolipids I. Mass spectrometric structure investigation of the isomeric halogeno-propanediols esterified with fatty acids (deoxyhalogenoglycerides). Journal für Praktische Chemie 321(5):756-768.

Leon N, Yusa V, Pardo O, Pastor A. 2008. Determination of 3-MCPD by GC-MS/MS with PTV-LV injector used for a survey of Spanish foodstuffs. Talanta 75(3):824.

Meierhans DC, Bruehlmann S, Meili J, Taeschler C. 1998. Sensitive method for the determination of 3-chloropropane-1,2-diol and 2-chloropropane-1,3-diol by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A 802:325-333

Nyman PJ, Diachenko GW, Perfetti GA, Nyman PJ, Diachenko GW, Perfetti GA. 2003. Determination of 1,3-dichloropropanol in soy and related sauces by using gas chromatography/mass spectrometry. Food additives and contaminants 20(10):903.

Rahn A, Yaylayan VA. 2010. Thermal degradation of sucralose and its potential in generating chloropropanols in the presence of glycerol. Food Chemistry 118:56-61

Retho C ja Blanchard F. 2005. Determination of 3-chloropropane-1,2-diol as its 1,3-dioxolane derivative at the micro g kg⁻¹ level: application to a wide range of foods. Food additives and contaminants 22(12):1189.

Robert M-C, Oberson J-M, Stadler RH. 2004. Model studies on the formation of monochloropropanediols in the presence of lipase. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(16):5102-5108.

Seefelder W, Varga N, Studer A, Williamson G, Scanlan FP, Stadler RH. 2008. Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD. Food additives and contaminants 25(4):391.

Svejkovska B, Novotný O, Divinová V, Réblová Z, Dolezal M, Velisek J. 2004. Czech J. Food Sci. 22(5):190-196

Svejkovska B, Dolezal M, Velisek J. 2006. Formation and decomposition of 3-chloropropane 1,2-diol esters in models simulating processed foods. *Czech journal of food science* 24(4):172.

Velišek J, Doležal M, Crews C, Dvořák T. 2002. Optical isomers of Chloropropanediols: Mechanisms of their Formation and Decomposition in Protein Hydrolysates. *Czech J. Food Sci.* 20(5):161-170

Velišek J, Calta P, , Crews C, Hasnip S, Doležal M. 2003. 3-Chloropropane-1,2-diol in Models Simulating Processed Foods: Precursors and Agents Causing its Decomposition. *Czech J. Food Sci.* 21(5):153-161

Weißhaar R. 2008. Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *European journal of lipid science and technology* 110(2):183.

Wenzl T, Lachenmeier DV, Gökmen V. 2007. Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Anal Bioanal Chem* 389:119-137.

Zelinkova Z, Svejkovska B, Velisek J, Dolezal M, Zelinkova Z, Svejkovska B, Velisek J, Dolezal M. 2006. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food additives and contaminants* 23(12):1290.

Zelinkova Z, Novotny O, Schurek J, Velisek J, Hajslova J, Dolezal M, Zelinkova Z, Novotny O, Schurek J, Velisek J, Hajslova J, Dolezal M. 2008. Occurrence of 3-MCPD fatty acid esters in human breast milk. *Food additives and contaminants* 25(6):669.

Zelinkova Z, Dolezal M, Velisek J. 2009. Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in infant and baby foods. *European food research and technology* 228(4):571.

Zelinkova Z, Dolezal M, Velisek J. 2009. 3-Chloropropane-1,2-diol Fatty Acid Esters in Potato Products. *Czech J. Food Sci.* 27, Special Issue: 421-424

LIITTEET

Liite 1 Hydrolysoitujen 3-MCPD:n ja 3-MCPD-d5:n kaasukromatogrammien piikkien pinta-alat

Taulukko 1. Natriummetoksidimenetelmällä hydrolysoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien kaasukromatogrammien piikkien pinta-alat.

Näyte nro	Piikin pinta-ala		Pinta-alojen suhde
	3-MCPD	3-MCPD-d5	
1	388413	533060	0,73
2	245307	366239	0,67
3	295230	360860	0,82
4	233670	304776	0,77
5	236958	359321	0,66
6	202883	322614	0,63
7	284932	390160	0,73
8	206019	278848	0,74
9	250818	350181	0,72
10	178060	278557	0,64

Taulukko 2. Happohydrolyysimenetelmällä hydrolysoitujen 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-palmitiiniesterien kaasukromatogrammien piikkien pinta-alat.

Näyte nro	Piikin pinta-ala		Pinta-alojen suhde
	3-MCPD	3-MCPD-d5	
1	493140	741943	0,66
2	454913	554506	0,82
3	460751	694973	0,66
4	558196	801227	0,70
5	255512	400673	0,64
6	338018	474923	0,71
7	472115	696660	0,68
8	536151	811937	0,66
9	549288	806733	0,68
10	649068	841254	0,77